

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-50881

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月5日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/02	ZNA C	9282-4B	
C 12 N 1/19		8828-4B	
9/90		9152-4B	
15/09			
	9281-4B	C 12 N 15/00	A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 37 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平6-561587
(22)出願日	平成5年(1993)6月2日
(23)翻訳文提出日	平成6年(1994)12月12日
(26)国際出願番号	PCT/US93/05318
(27)国際公開番号	WO93/25676
(28)国際公開日	平成5年(1993)12月23日
(31)優先権主張番号	901.213
(32)優先日	1992年6月12日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	マルク エンド カンパニー インコーポレーテッド アメリカ合衆国、ニュージャージィ 07065、ローウエイ、イースト リンカーン アヴェニュー 126
(71)出願人	ユニバーシティ・オブ・ケント・アット・カンタベリー イギリス国、ケント・シー・テイー・2・7・エヌ・ゼット、カンタベリー、ザ・レジストリー(登録なし)
(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の産生を増加させる方法

(57)【要約】

酵母によって產生されるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質、特に組換え分泌タンパク質の収率を増加させる方法を示す。タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)酵素は分泌及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の形成を触媒する。ここでは、ヒトPDI又は酵母PDIを調節的に過剰產生する酵母Saccharomyces cerevisiaeの組換え株の構造を開示する。これらの株は、治療面で潜在的に重要なジスルフィド結合をもつタンパク質を極めて多量に分泌する。これらの株は、ジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質の産生を増加させる可能性を有する。

特表平7-508881 (2)

請求の範囲

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、  
 (a) 組換え酵母内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを発現させるステップ、及び  
 (b) 前記組換え酵母内で、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ  
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. メンバ (a) でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素をコードする組換え表現カセットのコピーを一つ以上含む請求項 1 に記載の方法。
3. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする表現カセットが宿主細胞ゲノムに組込まれる請求項 2 に記載の方法。
4. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする表現カセットが直接的構成プラスミド上に含まれている請求項 2 に記載の方法。

1. 酵母が Saccharomyces cerevisiae 又は Cryptococcus neoformans 属の種である請求項 1.0 に記載の方法。
2. 酵母が Saccharomyces 属の種である請求項 1.1 に記載の方法。
3. 酵母が Saccharomyces cerevisiae である請求項 1.2 に記載の方法。
4. ステップ (b) の組換え遺伝子がアンチスクランブルである請求項 1.3 に記載の方法。
5. ステップ (b) の組換え遺伝子がマダニ前髪タンパク質である請求項 1.4 に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.5 に記載の方法。
7. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.6 に記載の方法。
8. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.7 に記載の方法。
9. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.8 に記載の方法。

5. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の表現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が、一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項 1 に記載の方法。
6. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の表現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組込まれる請求項 1 に記載の方法。
7. ステップ (b) のジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする組換え遺伝子が宿主細胞ゲノムに組込まれる請求項 1 に記載の方法。
8. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする表現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項 5 に記載の方法。
9. ステップ (a) の組換え酵母が哺乳動物である請求項 1 に記載の方法。
10. ステップ (a) の組換え酵母が酵母である請求項 1 に記載の方法。

1. ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の製造方法であって、  
 (a) 組換え酵母宿主細胞内で組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを産生するステップ、及び  
 (b) 前記組換え酵母内で、分離ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質をコードする一つ以上の組換え遺伝子を発現させるステップ  
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.0 に記載の方法。
3. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが哺乳動物タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.1 に記載の方法。
4. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項 1.2 に記載の方法。
5. ステップ (a) でタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ酵素を産生する組換え酵母宿主が、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする組換え表現カセットのコ

### 特表平7-508881 (3)

ビーカー一つ以上含む請求項19に記載の方法。

24. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが酵母細胞表面ゲノムに組込まれる請求項23に記載の方法。

25. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセットが自転的複合プラスミド上に含まれている請求項23に記載の方法。

26. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが、一つ以上のプラスミド上に含まれている一つ以上の発現カセットでコードされ、ジスルフィド結合をもつタンパク質をコードする組換え遺伝子が一つ以上のプラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

27. タンパク質ジスルフィドイソメラーゼをコードする発現カセット及び組換え遺伝子が同一プラスミド上に含まれている請求項19に記載の方法。

28. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母宿主を3.0%以下の濃度で増殖する請求項19に記載の方法。

29. ジスルフィド結合をもつ一つ以上のタンパク質を発現させるために、組換え酵母を約2.0%～2.8%の濃度で

増殖する請求項28に記載の方法。

30. ジスルフィド結合をもつタンパク質がアンテスタンシンである請求項28に記載の方法。

31. ジスルフィド結合をもつタンパク質がマダニ抗凝血タンパク質である請求項28に記載の方法。

32. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを產生する酵母 Saccharomyces cerevisiae 的株。

33. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼがヒトタンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

34. 組換えタンパク質ジスルフィドイソメラーゼが酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼである請求項32に記載の酵母株。

#### 明細書

サッカロミセスセレビシアエによるジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の產生を増加させる方法

#### 発明の背景

タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分泌タンパク質及び細胞表面タンパク質におけるジスルフィド結合の構築に関わる酵素である。脊椎動物 PDI の保存された (conserved) 「チオレドキシン様」活性部位を検出するように設計されたオリゴタクレオチド (WCGHCK) (配列番号: 1) を用いて、本発明者らは下寄生真核生物 Saccharomyces cerevisiae からアミノ酸をコードする遺伝子を単離した。クローニングした遺伝子のスクレオチド配列及び活性測定結果は、分子量 59,082 及び pI = 4.1 の 530 アミノ酸からなるタンパク質を示すが、これらは脊椎動物 PDI の物理的性質である。また、アミノ酸配列は哺乳動物及び鳥類の PDI 配列に対して 50%～32% の同一性と 53%～56% の類似性とを示し、全体的構造が極めて類似しており、特に、各々が反復性である三つの 100 アミノ酸セグメ

ントが存在する。哺乳動物及び鳥類の PDI に対する最も大きな相違は、保存された「チオレドキシン様」活性部位を含む領域 (a, b) にある。日本地盤域は調査可能な分菌シグナル配列の特徴を有しており、C 末端の 4 個のアミノ酸 (-HDEL) (配列番号: 2) は、或タンパク質が S. cerevisiae 小胞体 (ER) の成分であるということと合致している。この遺伝子 (PDI1 と称する) の複数のコピーを有する形質転換体は 10 倍の上の活性レベルを有し、予測された分子量のタンパク質を過剰発現する。PDI1 遺伝子は酵母ゲノム内で非反復性であり、定期的細胞には存在せず、また熱感受性もできない单一の 1, 8 及び 6 個存在体をコードする。PDI1 遺伝子の喪失はハプロ致死性 (haplo-lethality) であり、これが該遺伝子の産物が生存能力 (viability) にとって必須のものであることを意味する。

チオール：ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、分泌細胞の L, R, 内膜 (lumen) の主な常在タンパク質成分である。該酵素の活性分布、細胞内の位置及び発現部位に関して立証された一連の事実は、該酵素が分泌タンパ

著者平7-508881 (4)

ク質の生成である他の役割を果たすことを示唆しており (Frederick, 1984; Trends Biochem. Soc., 2, pp. 438-441)。これはその場での (in situ) 遺伝的調査結合の研究によって裏付けられている (Rothblum 及び Pfeifer, 1987; Biochemistry, 26, pp. 4179-422)。PDI を欠失しているミクロソーム液が同時に (cotranslational) タンパク質のジスルフィド形成の特異的欠如を示すという発見は (Bulliard 及び Freedman, 1988; Nature, 335, pp. 649-651)、該酵素が分泌及び細胞表面タンパク質の生合成の間に天然ジスルフィド結合形成の核膜として機能することを意味する。この役割は、該酵素の二オキシタウロの触媒活性について知られている事実、即ち該酵素がチオール-ジスルフィド交換反応を触媒して正味のタンパク質ジスルフィドの形成、破壊又は異化化を生起させ、且つ多様にわたる選元され且つ折り畳みのないタンパク質基質においてタンパク質の折り畳み及び本末のジスルフィド結合の形成を越えて達成することができるという事実と一緒にしている (Freedman から, 1989; Bio-

hem. Soc. Symp., 55, pp. 167-192)。該酵素のDNA及びアミノ酸配列は幾つかの場について知られており (Scherzen, B. 他, 1991; Yamauchi, T. 他, pp. 185-298; Farquharson, R. 他, 1991; Gene, 108, pp. 81-89)。哺乳動物の胚層から類似して均質にした該酵素の作用のメカニズムに関する情報も増えている (Crotti 他, 1980; J. Mol. Biol., 142, pp. 43-62; Freedman, 1988; Biochem. Soc. Trans., 16, pp. 96-9; Gilbert, 1989; Biochemistry, 28, pp. 7298-7305; Lundstrom 及び Holmgren, 1990; J. Biol. Chem., 265, pp. 9214-9220; Hawkins 及び Freedman, 1990; Biochem. J., 275, pp. 385-399)。粗胞におけるタンパク質の折り畳み、アッセイブリード及びトランスロケーションの仲介酵素として現在推定されている多くのタンパク質因子 (Rothblum 他, 1989; Cell, 52, 591-601) のうち、PDI は明確に規定された

触媒活性を有するという点で希有である。

PDI は哺乳動物の粗胞から容易に抽出され、均質酵素は特徴的な酸性 pI (4.0~4.5) を有するホモダイマー (homodimer) ( $2 \times 57\text{ kDa}$ ) である (Williamson, 1984; Methods Enzymol., 107, pp. 281-292)。該酵素はコムギ及び藻類 Cyclotium album (Lainhart 他) からも精製された (Kasakar, 1990; Biochem., 26, pp. 63-68)。活性は広範囲の基質で検出されており、予測報告では、PDI 活性は主に coevolved において検出可能であると断言された (Williamson 他, 1988; FEBS Letters, 2, pp. 133-135)。最近になって、クローニングした cDNA 配列に先として由来する多くの PDI の完全アミノ酸配列が報告された。その中には、マウス由来 (Edmann, 1989; Nature, 335, pp. 267-270)、ラット由来 (Yamamoto 他, 1987; Biochem. Biophys. Res. Comm., 146, pp. 1485-1492)、ヒト由来 (Prasad Janani 他, 1987; EM

Bio. J., 5, pp. 643-9)、隣接由来 (Scherzen, B. 他, 前出引用文献; Farquharson, R. 他, 前出引用文献) 及びヒヨコ由来 (Parkkonen 他, 1988; Biochem. J., 254, pp. 1005-1011) の PDI がある。これらの脊椎動物種に由来するタンパク質は全体を通して高度の配列保存を示し、いずれも、最初にマウス PDI 配列で精算された幾つかの結合的特徴を示す (Edmann 他, 1988; 前出引用文献)。最も興味なものは、互いに組合して構成であり且つオレドキシン、即ち構造 Cys<sup>α</sup> 残基の間に形成された局所酸性ジスルフィドノジチオール結合を含む本末ハンドグレス活性タンパク質に密接に関連した配列を有する残基数約 100 の二つの領域が PDI 配列中に存在することである。オレドキシンでは活性部位配列が G G P C K (配列番号: 8) であり、PDI 中に二つ存在する対応する残基は配列 F C G N C K (配列番号: 1) を有する (PDI 配列中で同定された他の反復領域、モチーフ及び指向性については後で説明する)。

PDI に対応するか又は密接に関連した配列は、ジスルフィド結合の形成以外の機能の分析を目的とする研究で開

## 特表平7-508881 (5)

選された。例えば、PDIが、S. R. 内の新生 (newly synthesized) すなわち新合成 (newly synthesized) プロコラーゲンホリペプチドの主な翻訳後修飾を触媒する粗膜体  $\alpha_2\beta_1\gamma_1$  脱水プロリル-4-ヒドロキシラーゼのサブユニットとして作用するという事実が立証されている (Pihlajaniemiら, 1987; 初出引用文献: Kojimら, 1987, J. Biol. Chem., 262, pp. 6447-68)。また、PDIが粗膜のN-アセチル化のシステムに関与することを示唆する事実もあり (Geetha-Habibら, 1988, Cell, 54, pp. 63-68)。最近では、硫酸素が、トリグリセリドを新生分泌リボタンパク質に交換する複合体に関与しているという説も出ている (Wahlstromら, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 9800-7)。このように、PDIは分泌タンパク質の翻訳後修飾で複数の機能を果たし得る (Freedman, 1989, Cell, 57, pp. 1069-72)。

哺乳動物分泌タンパク質の大多数は、複数の分子内及び／又は分子間ジスルフィド結合を有している。非親和的興

味としては、下垂体ホルモン、インターロイキン、免疫グロブリン、プロテアーゼ及びその阻害物質、並びに他の血漿タンパク質が挙げられる。この種のタンパク質は商業的遺伝子工学の主要標的の一つであるが、細胞及び酵母内でのこれらタンパク質の発現における初期の体験では、これらのタンパク質を効率的に活性な粗挽き液として得る上で多くの問題があることが指摘された。その結果、一般的には細胞膜脛、特に酵母細胞では、ジスルフィド結合形成をより深く解明する必要が認識されるようになった。

單一の折り畳みドメインを有するジスルフィド結合をもつタンパク質は通常、直後にジスルフィド結合した状態を著しい比率で形成するために、完全に進元、縮合し、次いでミルクドドミタで再生することができる。このプロセスでは、ゆっくり異性化して天然のジスルフィド結合を生成する多くの蛋白質にジスルフィド結合した形態の混合集団が迅速に形成される。該プロセスは、チオール／ジスルフィド酸化還元酵素 (例えばGSH及びGS-SG) 及びアルカリ性蛋白質によって触媒される。改組及び供給ジスルフィド形成を防止するためには、タンパク質濃度を低くする必

要がある。通常は、天然タンパク質の生成速度及び実験可能な収率はどちらも、分子内ジスルフィド鍵の増加に伴って低下する。この問題は、各ドメインが折り畳まれてそれぞれの天然ジスルフィド結合を独立して形成しなければならない複数のジスルフィド結合ドメインを含むタンパク質 (例えば組織プラスミノーゲン活性化因子) ではより重大である。

ヨーロッパのジスルフィド結合形成プロセスは、翻訳と同時に、又は極めて早期の翻訳後修飾として走る。哺乳動物細胞のS. R. 内腔の新生及び新合成成分のタンパク質の研究では、天然ジスルフィド結合が既に形成されていることが判明している。In vivoのプロセスは、分泌細胞内に蓄積に存在するタンパク質であり小胞体の内腔面 (luminal face) に局在する酵素、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼによって触媒されると思われる (Freedman, R. B., 1984, Trends in Biochemical Sciences, 9, 438-441)。この酵素はIn vitroで、広範囲のタンパク質諸質においてチオール・タンパク質—ジスルフィド交換反応を触媒し、天然タンパク質ジスルフィ

D形成の細胞膜に必要とされる特性を有する [Freedman, R. B. ら, 1984, Biochim. Biophys. Acta, 806, 73-81]。該酵素の役割を明らかにする別の事項としては、(i) 该酵素の粗膜分布がジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成のそれと合致するという事実 [Brockway, B. E. ら, 1980, Biochem. J., 191, 873-876]、及び(ii) 多くの系で、存在する酵素の量が、ジスルフィド結合をもつ分泌タンパク質の合成速度の出現学的変化に平行して変化するという事実 [Brockway, B. E. ら, 1980, Biochem. J., 191, 873-876; Freedman, R. B. G., 1983, "Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological & Clinical Aspects", A. Larsson, S. Ogrenius, A. Holmgren & B. Mannerås編, Raven Press, New York, pp. 271-282; Paver, J. L. G., 1989, FEBS Letters, 242, pp. 857-

## 特許平7-508881 (6)

382) が挙げられる。

該酵素の発現は、多くの動物類 [Sambrook, J., 及び Freedman, R. B., 1983, Biochem. J., 213, p. 225-234] 及びコムギ [de Azevedo, G. M. V. L., 1983, Biochem. Soc. Trans., 12, 1043] で解明されており、分子構造及び動力学的特性の類似性保存が観察された [Freedman, R. B. L., 1984, Biochem. Soc. Trans., 12, pp. 939-942; Brockway, B. B. 及び Freedman, R. B. L., 1984, Biochem. J., 219, 51-59]。しかしながら、該酵素は、丁等真核生物又は細菌においてはまだ十分に研究されていない。少なくとも一部の酵母分離タンパク質（例えばモーター酵素）はジスルフィド結合を含んでいたため、酵母と高等真核生物との間の、分離に関与するメカニズム及び分子成分の調査の相違点は、該酵素又は粗筋体が酵母内に存在することを強く示唆させる。

商業的に重要な哺乳動物タンパク質の発現のための方針確立 (versatility base) としての酵母の選

用は、酵母分離率の固定された能力、及び能能力と高等真核生物のそれとの相連（例えばブリコシル化における相連）によって、ある程度の基礎を強められる。

本発明は、酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え宿主細胞内でジスルフィド結合タンパク質を選択するための新規の方法と、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼを過剰発現する組換え酵母細胞とを提供する。本発明は、ジスルフィド結合をもつ組換えの酵母タンパク質の分離を実質的に且つ子機器に増加させる組換え酵母宿主細胞も提供する。

### 発明の概要

ヒト及び酵母タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードするDNAを用い、プロモーターと転写ターミネーターとを含む表現カセット又はベクターにクローニングする。タリスをコードするDNAを含む表現カセット又はベクターを宿主細胞内にトランスクーラーすると、該細胞はPDIタンパク質を過剰発生する。これらのPDI過剰発生細胞を、ジスルフィド結合をもつタンパク質の開発のための組換え宿主として使用する。ジスルフィド結合をもつタンパク質の分離は、PDI過剰発生細胞では、

通常レベルのPDIを産生する宿主細胞と比べて実質的に増加する。

### 図面の簡単な説明

第1図は、マルチコピープラスミド上に酵母PDIをコードする遺伝子を有する *S. cerevisiae* 形質転換体の無細胞液解液の SDS-PAGE分析を示している。

第2図は、「COMPARE」及び「DOTPLOT」ソフトウェア (UWGGC) を用いた酵母PDIとラットPDIとの間のドットプロットアライメント (dot plot alignment) を示している。哺乳動物PDIのドメイン構造は同じ縮尺で前述アライメントの下に示されている。

第3図は、酵母PDI上遺伝子の破壊に関するストラテジー及び結果を示している。バトル (b) は、*pDI1* : *HIS3* 破壊に対して異型接合体の *HIS3* : *AS3* の四分子 (tetrad) 分析の結果を示す。

第4図はプラスミドpUC18-GAL10pの構造を示している。第5図はプラスミドpUC-GAL1-pSP-hPDIの構造を示している。

第6図は、pUC18-GAL10p (S) ADH1と

としても知られているプラスミドp401の構造を示している。

第7図はプラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-EADH1の構造を示している。

第8図は、K991としても知られているプラスミドpKHA22/ATSの構造を示している。

第9図はYEP24-GAL10p-yPDIの構造を示している。

第10図はYEP24-GAL10p-yPDIの構造を示している。

第11図はpUC-GAL1/10-hPDI/ATSの構造を示している。

第12図はpUC-GAL1/10-yPDI/ATSの構造を示している。

### 発明の詳細な説明

酵母におけるタンパク質の折り畳み及び分離のプロセスは極めて複雑であり、遺伝子研究に基づいて最もは、30以上の遺伝子産物が同定している (Frantszeski, A. S., 1981, Methods Enzymology, 194, p. 662-674)。これらの生物をし

## 特表平7-508881 (7)

及びゾヌスルフィド結合形成の促進に関連していると用いられる現象である。

本発明は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) をコードするDNAを過剰発現させることにより、酵母及宿主細胞による組換えタンパク質の生成を増加させる方法を提供する。本明細書中のPDIとは、分子内及び分子間ジスルフィド結合の形成を特異的に触媒する酵素を意味する。

幾つかの種に由来するPDI遺伝子のDNA配列は当業界で知られている。これらの種の非選択性的具体例としては、ヒト、ウシ、ラット、ニワトリ及び豚等が挙げられる。(Mizunaga S., 1990, J. Biochem., 118, pp. 846-851; Scherzenbach, I. 1991, Yeast, 7, pp. 185-193)。

PDIをコードするDNAの発現における選択対象は多くの種類の細胞又は組織であってよく、選択性的具体例としては、哺乳動物及び他の脊椎動物の細胞及び組織、並びに下等真核生物の細胞及び組織が挙げられる。ここでは本発明を、組換え酵母等の細胞内で表現される酵母及びヒトPDIを用いて説明する。当業者には容易に理解されるよ

うに、本発明では別の著者例、例えば限定的具体例として哺乳動物細胞、魚類細胞、細菌のような原核生物の細胞、昆蟲細胞、並びに酵母及酵母状微生物のようない下等真核生物の細胞を使用し得る。また、これも当業者には明らかのように、酵母及びヒト細胞以外の細胞に由来するPDIコードディングDNAの使用も本発明の範囲内に包含される。PDIコードディングDNAの別の種類の非選択性的具体例としては、ヒト以外の脊椎動物、例えばラット及びマウス、非脊椎動物、例えば昆蟲、並びに下等真核生物、例えば酵母が挙げられる。

Rothblat G. 及び Meyer T. の方法 (1986, Cell, 44, pp. 619-28) の方法でS. cerevisiaeから回収したミクロソーム脂質フラクションは低レベルのタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 活性を有していたが、該レベルは著者処理によって8~20倍増加した。これは、脊椎動物の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Mittis, 1983, Biochem. J., 213, pp. 245-8) 及び Lambert 及び Freedman, 1985, Biochem. J., 228, pp. 635-45) 及びコムギ

の同じ細胞コンパートメントに存在するPDI (Rodak, 1982, FEBS Lett., 128, pp. 123-4) と類似の酵素が、酵母の小胞体の内腔に存在することを示唆するものであった。高等真核生物酵素に対して構造的、PDIをコードする遺伝子をクローニングした。高度の保守を示す可能性が最も高い領域は、脊椎動物PDIにおいて高度に保存されており、特に二つの機能性ジオール活性部位の領域でチオレドキシンに対して強めて強い相同期性を示す被认为のドメインであると思われる。后半部は中性配列は PYA PWC G N CK (配列番号: 4) である (Parkkonen S., 1988, 前出引出文献)。赤道活性30マーオリゴスクレオチドを酵母コードンバイアス (bias)に基づいて設計し (Sehgal, 1986, Nucleic Acids Res., 14, pp. 5125-43)、これを末端標識して、マルチコピーヤードラムスミド pMA3を内で構築した酵母ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用した (Crouzet 及び Toulme, 1987, Mol. Gen. Genet., 210, pp. 581-3)。スクリーンから二つの中でも優れた活性のクローニング (G7 及び G8 と称する) が同

取され、予備制限部位を作成した結果、導入体サイズはそれぞれ 1.4 kb 及び 1.4, 3 kb であり、二つの導入物は共通の制限部位をいくつか有することが判明した。クローン C 7 の導入物を更に分析した。

クローン C 7 が確かに PDI をコードすることを確認するためには、酵母 *S. cerevisiae* 錠 MD 4.0 / 4c [a] trp1 ura3 his3 lacZ : Trp1 (1986, E. M. B. O., J., L., pp. 603 - 608) をクローニング及び既プラスミド pMA3 で形質転換した。S 2 K S - PAGE 分析の結果、C 7 の導入体は、主要 5.8 kDa ポリペプチドを過剰発現し、若そらくは約 7.7 kDa の第二のポリペプチドも過剰発現することが判明した (第 1 図)。また、二つの酵母の制限部位解放を PDI 遺伝子についてアッセイしたところ、C 7 の実験体は 10 倍の PDI I 活性レベル (3.8, 6 × 10<sup>-11</sup> U / mg クロマト質) を示した。これら二つの事実は、活性部位配列 WCGPCK (配列番号: 3) を有する *S. cerevisiae* テオラレドキシン単分子量が約 1.2 kDa であるため (Porqueira, 1970, J. Biol. Chem., 245, pp. 2363 - 70)、C 7 クロ

ーンが PDI をコードし、テオラレドキシンをコードしないという見方を裏付けるものであった。

確定上の PDI フラグメント配列の位置を決定する (Localization) ために、C 7 クローンを種々の制限酵素で消化し、消化産物をニトロセルロースにトランスファーし、前述の S 2 K S 「活性部位」オリゴスクレオチドをプローブした。この操作では、S 2 K S の BamH I - SacI フラグメントと、それぞれ 5, 4 及び 4, 5 kb の二つの明らかに隣接している HindIII - HindIII フラグメントとが同定された。後者のバターンは、活性部位のコピーを二つ含む PDI I について予測されるであろうように、「活性部位」プローブの標的が二つ存在することを示唆するものであった。二つの HindIII - HindIII 部位からの予測の DNA 配列分析では、脊椎動物 PDI I に対して弱い相同意を示す繰り返し (ORF) の存在が明らかにされたが、これらは複数配列ではないため、他にも HindIII 部位が存在するに違いないことも判明した。この推測は、詳細な制限部位図の作成と DNA 配列決定によって確認された。実際の制限部位とオリゴスクレオチドプライマーを用いて、二つの隣接 HindIII 部位を含む 2, 6 kb の HindIII

III - HindIII フラグメントの配列決定を両方の端で行った。

DNA 配列は、予測された分子量 5, 032 の、5.3 kb のアミノ酸をもつポリペプチドをコードすることができる 1.593 bp の單一読み取り枠の存在を予測させた (Farrington, R., 1971, 前出引用文献、第 2 図参照)。読み取り枠は、通常に多いタンパク質をコードする酵母由来 RNA に典型的なコドンバイアスを有していた (Bennetzen 及び Hall, 1982, J. Biol. Chem., 257, pp. 3029 - 3031)。コドンバイアス指数 (codon bias index) の計算値は 0.60 であった。

決定されたスクレオチド配列の分析は、多数の標準的酵母プロモーター及びダースネーターをチープを明らかにした (Porqueira, R., 1971, 前出引用文献、第 2 図参照)。これらのモーターカーは、読み取り枠に対して -100 と -128 との間に位置する (T A) <sub>11</sub> 配列の一部分としてのすく T A ボックス接着部位と、位置 -201 と -238 との間のビリミジンに富んだ領域 (3' ポリオキシアルデヒドのうちの 3') を含む。読み取り枠の 3' 端端には、T A A

翻訳ターミネーターに続いて、*S. cerevisiae* 内での転写終止部位及び / 又はアリアデニル化のシグナルと直連される配列 (Zaret 及び Sherman, 1982, Cell, 28, pp. 568 - 73)、並びに真核生物ポリアデニル化部位 (Proudfoot 及び Brownlee, 1976, Nature, 264, pp. 211 - 4) の両方に對する相図が存在する。

該クローン化遺伝子が転写されたかどうかを調べるために、読み取り枠に対して内因の S 2 K S 的 HindIII - SacI フラグメントを用いて、二つの異なる検索剤、グルコース及びアセテートで、異なる培養サイクル段階まで増殖させた *S. cerevisiae* の二つの異なる株 (MD 4.0 / 4c 及び SKQ 2c [a] / a - ade1 / + ade2 / + his3 / + ; Gattisoni, 1979, J. Biol. Chem., 254, pp. 3965 - 3969) から調製した全 RNA 調査のノーザンプロットをプローブした。指標増殖細胞では、グルコース及びアセテート培養細胞で唯一の 1, 6 kb の配对体が検出されたが、非増殖細胞では転写体は殆ど検出できなかった。転写体のサイズは、細 RNA の 5' 及び 3' 端部内の非標記配列の

## 特表平7-508881 (9)

約200スクレオチドを考慮に入れて、被取り替により平均された通りであった。

予測されたアミノ酸配列は、下記の理由によって該配列が正にPDIであることを強く示唆した：

(1) 予測された59kDaの分子量と、哺乳動物PDIに特徴的な $\beta$ 1(4, 1)とを有していた；

(2) 被アミノ酸配列は、B12SATP1Tソフトウヌア(CGGCGG, University of Wisconsin)によって決定されたように、先に報告された哺乳動物及び鳥類のPDI配列に対して、3.0~5.2%の全般的同一性と、5.8~5.6%の全般的類似性を示した；

(3) 该アミノ酸配列中の位置58~66及び403~430に「ナオリドキシン様」活性部位の二つのコピーを含んでいた。また、これらの配列は、哺乳動物PDI内の重複 $a/a'$ 領域に對して高度のアミノ酸同一性を示す物よりアミノ酸のより大きな内部重複(Internal duplication)の一剖分であった(第2図)。酵母及び哺乳動物PDI配列を並べると(Catigay et al., 1989), 位置 $a'$ 領域の外側に、大きな相間を示す新的領域が存在することも明らかになった(第2図)。

O. F. S., 19814, Nucleic Acids Res., 12, pp. 1049~1068) を有する1.8kbの $\lambda$ -bamH1フラグメントがPDI Iコーティング配列内のEcoRV部位に挿入されている(第3図)。ヌル(null)対立遺伝子を構成した。Yeast 8二倍体酵母(Saccharomyces cerevisiae)株(AS3324; [Sparling, A., 1988, Ph.D. Thesis, University of Kent])を、PDI I : H1S 2遺伝子を、PDI I : H1S 3遺伝子を有するDNAフラグメントで形質転換して、PDI I 遺伝子の二つの染色体コピーのうちの一つを前記非機能対立遺伝子で置換した。三つのH1S1A503-2.6形質転換体(Y1, Y2及びY3)を更に構成した。いずれの場合も、二倍体の酵母形成体四分子当たり二つの生存可能孢子を産生しただけであり(第3図)、これらは能動的ではなかった。この結果は、致死型遺伝子がPDI I : H1S 2及ぶH1S 3対立遺伝子に開通していたことを示すものである。正確な遺伝子置換がH1S 2形質転換体Y1及びY2において生じたことは、800bpの $\lambda$ -bamH1-S1 $\lambda$ フラグメントをプローブとして用いる、PDI Iで消化したプロットされた酵母ゲノムDNAへのサザンハ

または、コードされたポリペプチドの前の二つの待機は、これがS. cerevisiae 小核体の成分であることを示唆している。該タンパク質は、推定上の分離シグナルの特徴を有する著しく疎水性のN-末端配列をコードし(Gierasch, 1989, Biochemistry, 28, pp. 923~930)、四つのC末端アミノ酸は酵母B1TPのそれと同じであり(Normington et al., 1989, Cell, 57, pp. 1223~36)。S. cerevisiae の小核体保持シグナルであると報告されている(Pelham, 1988, EMBO J., 7, pp. 1757~62)。

本発明者は、クローニング $\lambda$ -S. cerevisiae PDI I 遺伝子をPDI I 1と命名した。この $\lambda$ -S. cerevisiae PDI I 1遺伝子はゲノム内のたゞ一つのコピーに存在する。これは、酵母のG. 8kb Hind III-S1 $\lambda$ フラグメントを種々のゲノム消化酵物に対するプローブとして用いる高精度ハイブリダイゼーションにより確認された。

第一のPDI I 1遺伝子が生存能力に占める必須であるかどうかを調べるために、H1S 3 遺伝子(Monette et al.

イブリダライゼーションにより確認された。PDI I 1遺伝子は内部 $Pst$  I 部位を含まないが(第3図)、H1S 3 遺伝子は單一 $Pst$  I 部位を含むため(第3図)、これで $\lambda$ -PDI I : H1S 3 対立遺伝子は簡単に同定されるのである。予測されたように、非形質転換株S8324では單一の9kb  $\lambda$ -bamH1フラグメントが検出されたが、Y1及びY2形質転換体では9kb及び2.2kbという二つのバンドが、由来の異なる二つのバンドからなると推測される9kbバンドと共に検出された。これらのデータは、二つの染色体のうち一方の染色体上のPDI I 1遺伝子がH1S 3 対立遺伝子で置換され、このような事象がハプロ致死であることを立証するものである。

酵母PDI IをコードするDNAsを分子的にクローニングするためには、種々の方法のうち任意のものを選用し得る。これらの方法の非麻痺的遺伝子としては、適当な発現ベクター系内でのPDI I 含有DNAsライブクターの選択に次ぐ、PDI I 遺伝子の直接的機能発現が挙げられる。別の方法は、ベクタリオフラー又はプラスミドショットルベクター内で構築したPDI I 含有DNAsライブクターを、PDI I クロマト質のアミノ酸配列から抜取した酵母付着オリゴタクレオ

特許平7-508881 (10)

テドプローブマスクリーニングすることからなる。好ましい方法は、プラスミドシャトルベクター内で複数したヒト又は酵母PDI+含むゲノムDNAライプラリーを、酵素活性部位の既知のアミノ酸配列をコードする特定DNAプローブでスクリーニングすることからなる。

当業者には容易に理解されるように、別のタイプのライプラリー、及び別の細胞又は細胞タイプから精製したライプラリーもPDIをコードするDNAの単離に使用であり得る。別のタイプのライプラリーの実用的具体例としては、酵母細胞以外の別のセト、脊椎動物及び下等真核生物細胞又は細胞系に由来するcDNA及びゲノムDNAライプラリーが挙げられる。

当業者には明らかかのように、適当なライプラリーは、PDI活性を有する細胞又は細胞系から複製し得る。PDI cDNAを単離するためのcDNAライプラリーの形成で使用するための菌株又は細胞系の選択は、前述の方法を用いて、最初に細胞結合PDI活性を測定することにより実施し得る。

cDNAライプラリーの形成は当業者に良く知られている標準的方法で実施できる。良く知られているcDNAラ

イブタリー構築方法は、例えばManiatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

PDIをコードするDNAを適当なゲノムDNAライプラリーから単離し得ることも当業者には明らかである。

ゲノムDNAライプラリーの構築は当業者に良く知られている標準的方法で実施できる。良く知られているゲノムDNAライプラリー構築方法は、Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982) に記載されている。

前述の方法で得たクローニングPDIは、組換えPDIを産生するために、適当なプロモーターと別の適当な転写調

節エレメントとを組み発現ベクターへの分子クローニングにより組換え的に発現し、原核生物又は真核生物宿主細胞内にトランスファーし得る。この種の操作を行うための技術は、所出のManiatis, T. らの文献に詳述されおり、当業者には良く知られている。

本明細書では、発現ベクターは、遺伝子のクローン化コピーの教學と、cDNAの適当な宿主内での翻訳とに必要なDNA配列であると定義される。この種のベクターは、細菌、酵母、植物細胞、藻類、昆虫細胞及び動物細胞のような種々の宿主内で真核生物遺伝子を発現させるのに使用し得る。

特異的に設計したベクターは、宿主間、例えば細菌-酵母又は細菌-動物細胞間のDNAのシャトルリングを可能にする。通常に構築した発現ベクターは、宿主細胞内の自家的複製のための複製起点と、選択可能なマークーと、固定数の有用な制限酵素部位と、高カバー数へのポテンシャルと、結婚プロモーターとを含んでいる必要がある。プロモーターは、RNAポリメラーゼをDNAに結合させRNA合成を開始させるDNA配列であると定義される。強力なプロモーターは、向RNAが高頻度でイニシエートされる

ようとするプロモーターである。発現ベクターの実用的具体例としては、クローニングベクター、構築されたクローニングベクター、特異的に設計されたプラスミド又はウイルスが挙げられる。

哺乳動物細胞内で組換えPDIを発現させるためには、種々の哺乳動物発現ベクターを使用し得る。組換えPDIを発現に適し得る市販の哺乳動物発現ベクターの非特異的具体例としては、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSOG (Stratagene)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37583)、pDPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pDPV-MM1neo (842-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37198)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460) 及び pZD35 (ATCC 37566) が挙げられる。

PDIをコードするDNAはまた、他の組換え宿主細胞内の発現のために発現ベクターにクローニングし得る。組換え宿主細胞は原核生物、例えば非限定期具体例として

特表平7-508881 (11)

K 1、ADH 1、ADH 2、PYO 5及びGAP 4 9 1 (CDH 3) を利用し得る。また、組換え酵素内のPDHの発現をアッセイするためには、適当なアッセイシステム、例えばイムノプロットスはR 1 Aもしくはエンザイムイムノアッセイ (EIA) を使用し得ることも當業者には明らかであろう。

5. Saccharomyces は、増殖用炭素源としてのガラクトースの使用に開きしている酵素をコードする遺伝子を五つ有している。GAL 1、GAL 2、GAL 5、GAL 7及びGAL 10はそれぞれ、ガラクトキナーゼ、ガラクトースペルメターゼ、ホスチグルコムターゼの出発アイソザイム、α-D-ガラクトース-1-オスマヌクターゼ及びグルヒラニスフェラーゼ及びウツジンフロストガラクトース-4-エビメターゼをコードする。ガラクトースが存在しないと、これらの酵素の発現はほとんど検出されない。細胞をグルコースで培養し、次いでガラクトースを培養液に加えると、これらら種類の酵素はRNA転写のレベルで、少なくとも2,000倍だけ (GAL 5は例外であって、約2倍に増強される) 酷似的に構導される。GAL 1、GAL 2、GAL 5、GAL 7及びGAL 10遺伝子を分子

接種、又は真核生物、例えば非原核的具体例として酵母、哺乳動物細胞、例えば非原核的具体例としてヒト、ラット、サル及び霊長類動物由来する細胞系、並びに昆虫細胞、例えば非原核的具体例としてDrosophila 古來細胞系、及び粗挽えバキュロウイルス表現系と共に使用されるSaccharomyces cerevisiae frugipeda (SE 9) 昆虫細胞であってよい。最適なものとして使用し得る市販の哺乳動物細胞古來細胞系の非原核的具体例としては、CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、ST3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C1271 (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26) 及び MRC-5 (ATCC CCL 171) が挙げられる。

酵母細胞プロモーターは酵母宿主内でのPDH遺伝子の構造を開始させる。従って、當業者には容易に理解されるように、当書の酵母活性プロモーター配列、例えば非原核的具体例として、GAL 1、GAL 10、GAL 7、PYO

的にクローニングし配列決定した。それぞれのコーディング領域の5' 側の神経及びプロモーター配列は、lambda 遺伝子のコーディング領域に隣接して配置した。これらの実験で、ガラクトースの誘導に必要十分なプロモーター及び抑制配列が決定された。

5. Saccharomyces はまた、酵々がA口付のアイソザイムをコードする三つの遺伝子を有する。これらの酵素のうちの一つであるADH 1は、S. cerevisiae が酵素的増殖時にエタノールを炭素源として利用する能力に関与している。ADH 1 (アイソザイムをコードするADH 2 遺伝子の発現はグルコースにより異化代謝産物抑制されるため、0.1% (~1%) のレベルのグルコースの存在下では発現的増殖時のADH 2 遺伝子の構造は実質的に変わらない。グルコースが消失しており且つ非抑制性濃度が存在すると、ADH 2 遺伝子の構造は100~1000倍強められる。この遺伝子を分子的にクローニングして配列決定し、軽写の抑制構造 (transcriptional repression) に必要十分な構造及びプロモーター配列を決定した。

アルファ接合因子 (alpha mating factor)

(α) は、MAT の細胞とMAT の細胞との間の接合に必要とされるS. cerevisiae 性フェロモンである。このトリテカベプチドは、粗胚小胞体内に送られ、グリコシル化され、タンパク質分析的にプロセシングされて、細胞から分泌される最終成熟形態となるブレブロフェロモンとして発現される。この生化学的経路は、外米ギリベブチドの発現ストラクチャーとして利用されてきた。アルファ接合因子遺伝子は分子的にクローニングされ、プレプロトリーダー配列を有する該遺伝子のプロモーターは酵々のオリベブチドの発現及び分泌に利用されてきた。また、PYO 5 遺伝子プロモーターは低濃度ホスフェートによって誘導し得ることが判明した。これは、酵母内での外米タンパク質の生理学的に調節された発現にとっても有用である。

アルファ接合因子プロモーターは、表現型的に立てる細胞内でのみ活性を示す。5. Saccharomyces にはSIRとして知られている四つの遺伝子座があり、これらはα 及び α 情報の通常サイレントの別のコピーの抑制に必要なタンパク質を合成する。この抑制事象を妨害する遺伝子座 (tit) 等者が、これらの遺伝子座のうち少なくとも一つの座の遺伝子座内に存在する。この突然変異株で

は、35%での増殖が抑制を起こし、その結果、アルファ複合因子プロモーターが不活性である表現型的に生／死の細胞が生じる。濃度を20%にシフトすると、細胞は表現型的に生に突き、その結果プロモーターが活性になる。(4) S.I.R酵素を有する酵の使用は、幾つかの外来オリベブチドの制御された発現について説明してきた。

当業者には容易に理解されるように、PDIの発現のための適切な酵母株は応応細胞補助の中から選択される。適切な酵母株の非限定的具体例としては、プロモーター欠失及び変化したグリコシル化能力といったような遺伝子製的及び表現型的特徴を有するものが挙げられる。

Saccharomyces属は種々な種からなる。S. cerevisiaeは種々の外来オリベブチドの組換えDNA仲介発現のための宿主として最も一般的に使用されている。しかしながら、Saccharomyces属の他の種の間の区別は必ずしも明確ではない。これらの種の多くはS. cerevisiaeと交換することができ、S. cerevisiaeのプロモーターと類似の又は同じプロモーターを有していると思われる。結って、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための酵母株

の選択範囲は、Saccharomyces属の別の種、例えば非限定的具体例としてcarlsbergensis、diastaticus、elongisporus、kluyveri、montanus、norbensis、ovaliformis、rouxii及びvarrumにまで広がる。

幾つかの酵母属、例えばCandida、Hansenula、Pichia及びTorulopsisは、唯一の増殖用酵素源としてのメタノールの利用について酵素の代謝経路を有することが判明した。この代謝経路に関する酵素であるアルコールオキシゲーゼの遺伝子はPichia pastorisから単離されている。E.P. pastorisアルコールオキシゲーゼプロモーターは單離されて、発現のメタノール誘導に敏感であることが判明した。このような誘導可能プロモーターは、酵母内でのオリベブチド発現に有用である。特に、このプロモーターは、P. pastoris内での異種遺伝子の誘導可能な発現用のプラットフォームであることが判明した。この結果は、別の酵母属が活性型のオリベブチドの組換えDNA仲介発現のための宿主として操作する可能性を強調するものである。

結って、当業者には容易に理解されるように、PDI発現のための宿主の選択範囲は、Saccharomyces cerevisiae及びCryptococcus属の別の酵母属の種、例えば非限定的具体例としてCandida、Hansenula、Kluyveromyces、Pichia、Saccharomyces属のTorulopsisにまで広がる。

発現ベクターは、多くの方法、例えば非限定的具体例として形質転換、トランスフェクション、プロトプラスト融合法及び電気穿孔法やうち任意の方法を用いて宿主細胞内に導入し得る。発現ベクター含有細胞はクローニングに難済し、種々に分析して、PDIタンパク質を確認するかどうかを調べる。PDI発現組換えクローンの同定は、幾つかの方法、例えば非限定的具体例として抗PDI抗体に対する免疫学的反応性、既報者細胞株白Pの「活性」の存在によって実施し得る。

PDI-DNAの発現はまた、in vitroで產生した合成mRNAを用いて実施し得る。合成mRNAは当業者の無相應システム、例えば非限定的具体例としてコムギ胚芽抽出物及び熟成赤血球抽出物中で簡単に調査できる。

と共に、細胞ベースのシステム、例えば非限定的具体例としてカエル卵母細胞内へのマイクロインジェクションで効率的に翻訳できる。

当業者には容易に理解されるように、PDIは、細胞当たり單一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞がノムに組込まれた組換え発現カセットに由来する組換え遺伝子を発現され得る。また、これら当業者には明らかであろうが、PDIは、細胞当たり單一のコピー又は複数のコピーで自律的複製プラスミド上に存在する組換え発現カセットに由来する組換え遺伝子内で発現され得る。

組換えPDIを発現する組換え遺伝子細胞は、別の組換え遺伝子の発現のための宿主として使用し得る。本発明の新規の方法は、組換えPDIを発現する宿主細胞内で、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAを発現させることにより、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の収率を実質的に増加させる。當業者には容易に理解されるように、本発明の方法ではジスルフィド結合をもつ種々のタンパク質が産生され得る。ジスルフィド結合をもつタンパク質の非限定的具体例としては、分離される又は物理結合状態を保持するタンパク質が挙げられる。

ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質の発現のための組換えDNA技術は、PDTについて詳述した方法によつて形成し得る。当業者には明らかなように、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、組換え当たり單一のコピー又は複数のコピーで、宿主細胞ゲノムに組込まれた組換え表現カセットから発現され得る。また、これも当業者には明らかであるが、ジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、細胞壁たり單一のコピー又は複数のコピーで、当業の複数のプラスミド上に存在する組換え表現カセットから発現され得る。更に、これも当業者には容易に理解されるこであるが、PDTをコードするDNA及びジスルフィド結合をもつ組換えタンパク質をコードするDNAは、組換え当たり單一のコピー又は複数のコピーで、同一プラスミド上に存在し得る。ジスルフィド結合をもつ二つ以上のタンパク質が、組込まれたカセットもしくはプラスミド上のカセット、又はこれらの組合わせから同時に発現され得ることも当業者には明らかである。

組換え宿主細胞内でのPDTの発現後は、PDTタンパク質を回収して、タンパク質中のジスルフィド結合の形成

(*cross-linking*)という用語は、抗体種が特定の抗原又はエピトープ、例えば前述のようなPDTと結合する能力を持つ。酵素免疫的抗体は、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ウツボ等の動物、好ましくはウサギを、免疫アジュバントを用いて又は用いながら、適当な濃度のPDTで免疫感作することにより產生する。

最初の免疫操作の前に免疫前血清を回収する。静脈じ得る免疫アジュバントと組合わせたPDTを約0.1mg～1.000mgまで各動物に投与する。静脈じ得る免疫アジュバントの非常規的異体例としては、フロイントの完全アジュバント、カウントの不完全アジュバント、ミコウバン抗体物、*Corynebacterium parvum*及びDNAを含む油中水エマルジョンが挙げられる。最初の免疫操作は、好ましくはフロイントの完全アジュバント中の酵素を、皮下(SC)、筋肉内(IP)又はその両方で複数の部位に注射することからなる。各動物から一定の時間間隔、好ましくは一週間隔で採血して、抗体力値を測定する。動物には、最初の免疫操作後は、ブースター注射をしてもしなくてもよい。ブースター注射をした動物には、通常、同量のフロイント完全アジュバント中酵素を回

を抽出することができる活性型の精製PDTを投与し得る。PDT精製方法は種々が存在し、使用に適している。突然起原に由来するPDTの精製について解説したように、組換えPDTは細胞溶質物及び脂質物、又はならし培養液から、椎分画、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排離クロマトグラフィー、ヒドロキシルアバタイト吸着クロマトグラフィー及び導体的相互作用クロマトグラフィーを組み合わせて又は僅々に組合して精製し得る。

更に、組換えPDTは、PDTに特異的なモノクローナル又はポリクローナル抗体を用いて形成した免疫アフィニティカラムを用いて、別の細胞タンパク質から分離することができる。

PDTに対する單一特異性抗体を、PDTに対して反応性を示す抗体を含む地衣動物抗体液から精製するか、又は Kohliger及びMitsleier, *Nature* 258: 496～497 (1975) に記載の方法を用いて、PDTに対して反応性を示すモノクローナル抗体として製造する。本明細書中の單一特異性抗体は、PDTに対する均一結合性を有する單一の抗体種又は複数の抗体種であると定義される。本明細書中の均一結合 (homogeneous)

一起點で可える。ブースター注射は、最大力値が得られるまで約1週間の期間で行う。各ブースター操作から約1週間、又は單一免疫感作の後で約1週間毎に動物から採血し、血液を回収し、アリコートを約-20°Cで貯蔵する。

地衣系マウス、好ましくは雌性1.6g/cをPDTで免疫感作して、PDTと反応するモノクローナル抗体(mAb)を製造する。マウスは、前述のように、I.P又はSC経路で、同量の酵素し得るアジュバントに混入した約0.5mlの緩衝液又は生理食塩水中約0.1mg～約1.0mg、好ましくは約1mgのPDTで免疫感作する。好ましくはフロイントの完全アジュバントを使用する。マウスは自己に最初の免疫感作を施し、約3～約4週間毎にわなって休息させる。免疫感作したマウスには、リン酸缓冲液生理食塩水のような緩衝液を約0.1～約1.0mlのPDTの投与からなる一回以上のブースター免疫操作を、静脈注射(IV)によって施す。抗体陽性マウスに由来するリンパ球、好ましくは脾臓リンパ球を、当業者が公知の標準的方法で免疫マウスから脾臓を除去することによって得る。脾臓リンパ球と過剰な融合相手、好ましくは骨髓腫細胞を、安定なハイブリドーマを形成させる条件下で混合して、

## 特表平7-508881 (14)

ハイブリドーマ細胞を製造する。融合相手の非限定的具体例としては、マウス骨髄液 P 3 / NS 1 / A s 4 - 1 : M P C - 1 E : S - 1 9 4 及び S p 2 / 0 が挙げられるが、好みいのは S p 2 / 0 である。抗体産生細胞及び骨髄細胞培養、約 3 0 % ~ 約 5 0 % の濃度で、約 1 0 0 0 m o l / w t. のポリエチレンジリゴール中で融合させる。当業者は公知の方法で、ヒボキサンチン、チミジン及びアミノブテリンを添加したダルベッコ改良イーグル培地 (D M E M) での増殖により、融合したハイブリドーマ細胞を選択する。約 3 4 , 7 8 及び 9 1 日目に増殖陽性ウェルから上清液を回収し、P D I を抗原として用いる固相イムノラジオアッセイ (S P I R A) のようなイムノアッセイによってスクリーニングし、抗体の産出を調べる。抗体のアイソタイプを調べるために、培養液を Ouchterlony 法又はアッセイでも検査する。抗体陽性ウェルからのハイブリドーマ細胞を、MacPherson の軟質滅菌技術 (Gel Agar Techniques, Tissue Culture Methods and Applications, Kruse 及び Peterson 著, Academic Press, 1973) によりクローン

化する。

初回脱原刺激 (primary stimulation) から約 4 日後、ブリスケン感作 B e 1 b / マウスに、マウス当たり約 0.5 ml まで、約 2 × 1 0 4 ~ 約 6 × 1 0 5 のハイブリドーマ細胞を皮内注射することにより、モノクローナル抗体をうなぎのように発生する。細胞のトランスクーラーから約 8 ~ 1 2 日後に尿水を回収し、当業者に公知の方法でモノクローナル抗体を精製する。

約 2 % のウシ胎児血清を含む D M E M 中でハイブリドーマを増殖させて *In vitro* の mA b 発生を行い、十分な量の特異的 mA b を得る。該あたりを当業者に公知の方法で精製する。

尿水又はハイブリドーマ培養液の抗体項を、種々の生物学的又は免疫学的アッセイ、例えば非競争的具休例として、沈降法、免疫凝集、E L I S A (Enzyme-linked Immunosorbent assay) 及びラジオイムノアッセイ (R I A) で測定する。細胞のアッセイを用いて、体液又は組織及び細胞抽出物中の P D I の存在を検出す。

当業者には容易に理解されるように、單一特異性抗体を

製造するための前述の方法は、P D I ポリペプチドフラグメント又は完全長さの P D I ポリペプチドに特異的な抗体の產生に使用し得る。

抗体がアガロースゲルベース支持体との共有結合を形成するように N - ヒドロキシスルシンメチドエヌカルド子鎖活性化したゲル支持体である A s f i g e i - 1 0 (B i o r a d ) に抗体を加えて、P D I 抗体アフィニティカラムを形成する。抗体は、スペーサーブームとのアモニア結合を介してゲルに結合する。次いで、残りの活性化ムスチルを 1 M ニクノールアミン H C l (p H 8) でクエンチする。カラムを水及び 0.2 M グリシン H C l (p H 2.6) で順次洗浄して、未結合抗体又は外來タンパク質を除去する。次いでカラムをリン酸緩衝液食塩水 (p H 7.3) 中で平衡化し、P D I を含む細胞培養上清又は細胞抽出物をゆっくりとカラムに通す。該カラムをリン酸緩衝液食塩水で光学密度 (A<sub>260</sub>) がバックグラウンドに低下するまで洗浄し、次いでタンパク質を 0.2 M グリシン H C l (p H 2.6) で溶解する。次いで、精製 P D I タンパク質をリン酸緩衝液生理食塩水に対して透析する。

以下の実施例は本発明を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

### 実施例 1

#### 株及び増殖条件

*Saccharomyces cerevisiae* 株 M D 4 0 / 4 C (M A T α, l e u 2 - 3 - 1 1 2, u r a 2, h i s 3 - 1 1, - 1 6, l e p 1) 及び A S 8 3 - 4 (M A T α / M A T " a " h i s 3 / h i s 3, l e u 2 / l e u 2, u r a 3 / u r a 3, l e p 1 / l e p 1) を、Y E P D (1 % バクトバズトン、1 % 酵母抽出生、2 % グルコース) 又は p D 6 , 8 種類最少培地 (0.67 % アミノ酸無含有酵母窒素ベース、2 % グルコース、1 % チオハク酸、0.6 % Na O H, 5.0 μg / ml メソイノシトール) に必要な培養及びアミノ酸を加えたものにて 30 ℃ で増殖させた。

*S. cerevisiae* 株 J R Y 1 8 8 (M A T α, s u t 3 - 8, l e u 2 - 1 1 2, l e p 1, u r a 2 - 3 2, h i s 4; Brake, A. J. S., 1 9 8 4, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 8 1,

## 特表平7-508881 (15)

p.p. 4842-4846) 及び B J 1996 (MAT<sub>a</sub>, leu2, arg1, ura3-52, prtB1-112, 2, pdp4-3, xal2; Jones, E. W., 1991, *Methods Enzymol.*, 194, p.p. 428-458) を P.D.I.選別装置の堅括に使用し、適当な実施例に記載のよう堆積させた。

大腸菌 (*Escherichia coli*) 株 DH5<sub>a</sub> (supE44ΔlacU169 (φ80lacZAM15) hsdR17 recA1 endA2 gyrA96 thiI-1 relA1) をプラスミドスクワーニング操作に使用した。

### 実施例 2

#### DNAの操作

制限マーカーーゼ消化及びDNAの連続化。酵素製造業者 (B C L, B R L) の指示に従って実施した。即ち、S. S.上形質転換の標準的プロトコル (Cohenら, 1972, P. N. A. S. U.S.A., 69, p.p. 2110-9) 及び S. cerevisiae 质質転換の標準的プロトコル (Beagles, 1978, *Nature*, 275, p.p. 6, 前述引用文献) 参照した。

非組込みスクレオチドから標識オリゴスクレオチドを分離すべく DE-52クロマトグラフィーを使用して、脱酸ライブリナーをスクリーニングするためには、前記オリゴスクレオチドを用いて [α-<sup>32</sup>P] dATP (Amersham, 3 0 0 0 C i/mmol/L) 及び T4ポリヌクレオチドキナーゼで末端標識した。次のようなコロニーハイブリダイゼーションにより、約 20, 000 DH5<sub>a</sub> 繁殖コロニーをニトロセルロースフィルターでスクリーニングした：各ニトロセルロースフィルターを、5%ホルムアルデヒド、6×SSC、1×デンhardt溶波、250 μg/ml トキソサケ精子DNA、0.1% SDS 中で、37°C で 1 時間にわたり予備ハイブリダイズした。標識オリゴスクレオチド (比活性 4, 8 × 10<sup>7</sup> dpm/μg) を 0°C で 3 分間煮沸し、次いで不溶ハイブリダイゼーション緩衝液中で 2 ルロ/mL に希釈し、フィルターに加えた。37°C で 16 時間インキュベートした後、フィルターを除出し、4×SSC、0.1% SDS 中で 2 分間複合した。該フィルターを一晩オートラジオグラフィーにかけた。

39 個の潜在的標的コロニーが同定され、これらを前述

104-9 : (1983, 1983, J. Bacteriol. 155, p.p. 163-8) を実施した。Holt らの方法 (1983, *Cane*, 42, p.p. 169-73) で S. cerevisiae からゲノムDNAを調達した。

### 実施例 3

#### P.D.I.遺伝子の単離

高コピー数 S. S. 2, 2 ミクロンベースベクター MA3a (Crouzet 及び Teitel, 1987, 同上引用文献) の BamH I 部位にクローニングされた S. cerevisiae 株 SKQ2a [α/α ade1/α ade2/α his1/1/+; Gal4 10nA]、前記引用文献】に由来する DNA の部分的 SalI フラグメントを含む酵母ゲノムライブリナーを、P.D.I. 遺伝子についてのスクリーニングに適用した。3'0マーカリゴスクレオチド (5'-CTTACACTGACCACACCCATGGAGCGTAGAT-3') (配列番号: 5) を、商業に販売されている「テオレドキシン珠」複合部位 (PYAPWCGHCK) (配列番号: 4) に対して、組み替母コードンバイアスを用いて (Sakai ら, 1986

のスクリーニングに更に 3 回かけると、その後で 10 個の陽性クローン (標識付き C 1 ~ C 10) が得られた。これらのクローンのうちの二つ (C 7 及び C 10) の制限由因を作成し、クローン C 7 を後続の研究のために選択した。

### 実施例 4

#### DNA配列の解析

配列決定に選した大分子のフラグメントを同定するためには、クローン C 7 を一連の制限酵素で消化し、3%アガロースゲル上でフラグメントを分離し、真波プロットティング装置 (Nipkow Ltd.) を用いて *Genesys* gen-Pilot プラン (D o P o l t) にトランスファーした。次いで、Maniatis らの方法 (1982, 前記引用文献) に実質的に従ってフィルターを予備ハイブリダイゼーションし、その後、前述のように実験標識し複合した 3'0マーカリゴスクレオチドプローブを加えた。ハイブリダイゼーションは 6×SSC 中 43°C で 24 時間実施し、次いで 2 回の洗浄を 200 mL の 2×SSC 中室温で各分間行い、更に 2 回の洗浄を 200 mL の 2×SSC、0.1% SDS 中 65°C で 1 時間行い、最後に 500 mL の 0.

### 特表平7-508881 (16)

1×SSC 中で室温で1回洗浄した。次いでフィルターを-70°Cで45時間オートラジオグラフィーにかけた。

フデオキシ核ターミネーター法 (Sanger ら, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463-67) を用いて、クローン C7 に由来する 2.4 kb の BamH I - BglI フラグメントを完全に配列決定した。配列決定に適した初期フラグメントを、Holmes 及び Quigley の迅速な方法 (1981, Anal. Biochem., p. 193-7) を用いて配列決定前に製造したプラスミド DNA 及び UGCI 8 と共にサブクローニングした。更に、幾つかのフラグメントを一本端ベクター mp12 又は mp13 にクローニングした (Messing, 1983, Methods in Enzymology, 101, p. 20-78)。一連の配列決定プライマー (1.5-1.8 μm) を合成した。これらのプライマーは、クローニングベクターのポリリンカーネ核酸、又は予め選定した内部 C7-DNA 配列にアンーリングする。プライマーのアンーリングに先立ち、プラスミド DNA を 0.2M NaOH、2 mM EDTA 中で 37°Cで 30 分間変性し、0.1% の 3M 脱酸ナトリウ

MDS. G の存在によって中和し、3 倍の 2.5% エクノールゼ-70°Cで 1.5 分間沈降させた。 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP (3000 Ci/mmol; ICN) を標識に使用して、in vitro の延伸法を行うために、T7-DNA ポリメラーゼ (Sequenase, U.S. Biochemicals) を製造業者の指示通りに使用した。反応各段に既述されている方法で解析した (Sanger ら, 1980, Genet. 78, pp. 323-30)。

### 実験例 5

#### RNA の製造及び解析

神戸 M 4 G / 4 c の培養細胞 (5 × 10<sup>4</sup> ~ 1 × 10<sup>5</sup> 細胞/m<sup>2</sup>) 又は定期細胞 (2 × 10<sup>4</sup> 細胞/m<sup>2</sup>) から完全 RNA を製造した。30 分間の熱衝撃 (30°C ~ 42°C) にかけた M 4 G / 4 c の培養細胞からも RNA を抽出した。完全 RNA は、本實験に従うるかの方法 (1980, Nucleic Acids Res., 8, 1-1, 2287-2392) に従って抽出した。

ノーザンプロット解析を次のように実施した： 30 μg の完全 RNA を 2.0% ホルムアルデヒド、5.0% 蒸留水

ホルムアミド中で 5% で 1.5 分間加熱することにより変性し、次いで 8% ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲル中で分離した。該 RNA を真空ボッティングセパレータセルロースフィルター (S 及び S、BA85) にトランスファーし、該フィルターを 1.0 mM Tris-HCl 中で 5 分間煮沸した。ハイブリダイゼーションを、1.0 × Denhardt 液液、2 × SSC、5.0 mM リン酸緩衝液 pH 6.5、4.0% ホルムアミド、0.1% SDS、4.00 μg/ml の <sup>32</sup>P 純度サケ精子 DNA 及び 1~5 ng/ml のプローブで 42°Cで一夜実施した。フィルターを -70°Cで 1~5 日間オートラジオグラフィーにかけた。使用したプローブは、PD<sub>11</sub> 対立遺伝子に由来する 0.8 kb の HI<sub>8</sub> I - S41 I フラグメント (Parquhar, R. ら, 前出引用文献、第2回参照)、並びに PBR322にクローニングした S. cerevisiae の 18S 及び 2.5S リボソーム RNA 遺伝子の一部分を含むプラスミド Scp7 (Dr. B. S. Cox, University of Oxford から入手) である。これらのプローブは、ランダムプライマー法 (BCL) で製造業者の指図に従って標識した。

### 実験例 6

#### PD<sub>11</sub> : H I<sub>8</sub> I 対立遺伝子の構造

H I<sub>8</sub> I 遺伝子を有する 1.8 kb の BamH I フラグメントをプラスミド pM A700 から抽出させ (Montiel ら, 1984, 前出引用文献)、1% アガロース (Seakem) 上で精製した。該フラグメントの BamH I 位に替換部位を、Maniatis らの方法 (1982, 前出引用文献) で、dNTPs と DNA ポリメラーゼのクレモウフラグメントとを用いて実施した。次いで PD<sub>11</sub> 上遺伝子の 1.2 kb BglI - BglI ITI フラグメントを、プラスミド pUGCI 8 のポリリンカーネ内 SmaI - BamH I 部位にサブクローニングした。最後に、H I<sub>8</sub> I 遺伝子を含む完熟した各 BglI フラグメントを、PD<sub>11</sub> コーディング領域内の唯一の EcoR V 部位に連結した (第3回)。得られた PD<sub>11</sub> : H I<sub>8</sub> I 対立遺伝子を 3.0% の S1 3 - EcoR IT フラグメント上に電泳させ、低融点アガロース上で精製し、1.0 ml の酢酸リチウム形態緩衝プロトコル (1983, 前出引用文献) を用いて二倍体株 AS3324 を用いたプロトコル

## 特表平7-508881 (17)

(proteolytropy) に影響を及ぼすのに使用した。

### 実験的

#### 1. ラミルペプチドの P.D.T. アッセイ

全タンパク質活性物における P.D.T. 活性のアッセイを、  
Hillis の方法 (1984, Methods Enzymol., 107, pp. 281-292) で実施した。

#### 装置の構成

スクランブルリボヌクレアーゼ (scrambled ribonuclease) は、ランダムに形成されたグヌルフィド結合を含む完全に酸化した混合物である。これは、市販の ( $\Sigma$  sigma) ワンホルムリボヌクレアーゼから下記の方法で調製する。

リボヌクレアーゼを、5.0 mM トリス-HCl 濃度液、  
pH 8.0, 6.0, 8.0 M 尿素、1.0 M 2-MGTAオトレイトル  
(還元可能グヌルフィド結合に対して約 1.5 倍モル過剰  
なジチオトレイトル) 中 8.0 同上 / 同上 (約 2.0 mg/ml)  
で、振幅で 1.5 時間 ~ 2.0 時間、又は 8.0 ml で 1 時間イン

反応混合物を水酸化で pH 4 に酸化し、その後後に  
脱ガスしたり、1.0 M 鹽酸で Sodex G-25 カ  
ラムから溶離することにより、還元タンパク質を分離する。  
2.8 nm で溶離フラクションをモニターし、タンパク質  
含有フラクションをプールし、反応リボヌクレアーゼを複  
数として用いて、タンパク質濃度を分光光学的に又は化学  
的に測定する。

還元リボヌクレアーゼの試料を 0.1 M 鹽酸で約 0.5  
mg/ml に希釈する。濃度尿素を最終濃度 1.0 M まで加  
え、塩酸カルコシンを 0.1 M まで加える (カルコシンは  
濃度尿素液中に存在するシアキートイオンと反応させる  
ために用いられ、カルバミル化によってリボヌクレアーゼ  
を不活性化し得る)。1.0 M トリスで pH を 8.0 に調整し、  
常所室温で 2 ~ 3 日間インキュベートする。その間にタン  
パク質は大塊のままによってランダムに酸化される。この  
インキュベーションの後で、5.0 M 2-MGTAオトレイトル  
(ニトロ安息香酸) を用いて還元チオール基を調べると、再  
活性化が完了していることが判明する (リボヌクレアーゼ分  
子当たり 0.1 以下の還元チオール)。

水酸化で pH 4 に酸化し、0.1 M 鹽酸中で Sodex

G-25 から溶離することにより、スクランブルリボヌクレアーゼの収率を回復する。タンパク質含有フラクションをプ  
ールし、1.0 M トリスで pH 8.0 に調整し、4℃で貯蔵する。

この方法によるスクランブルリボヌクレアーゼの収率は  
通常 9.0 ~ 10.0 % である。装置物は溶液中 4℃で 6 ヶ月  
まで安定であり、あるいは、5.0 mM NH<sub>4</sub>·HCO<sub>3</sub>,  
pH 7.0 中に透析し、次いで凍結乾燥して、-20℃で  
無脂質に対処し得る白色粉末固体物質としてもよき。

#### アッセイの手順

基質、スクランブルリボヌクレアーゼは、約 2 % の天然  
リボヌクレアーゼ活性を有する高分子量 RNA の加水分解  
開裂では本質的に不活性である。スクランブルリボヌクレ  
アーゼ中の分子間及び分子内グヌルフィドの交換の阻害に  
おける P.D.T. の作用は、天然グヌルフィド結合、天然密度  
を回復させ、RNA に対するリボヌクレアーゼ活性を随  
時に回復させる (concomitant reactivation)。  
このようにして、P.D.T. の活性を、凍結中にアリコート  
が採取されるタイムコース (time course) インキュベーションによってアッセイし、RNA に対するリ  
ボヌクレアーゼ活性を測定する。

タンパク質ジヌルフィド-イソメラーゼの試料を、5.0  
mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0, 5 ℃ に、最終量が 9  
0.0 μl になるまで加え、1.0 M 2-MGTAオトレイトル  
(1.0 μl の 1 ml 桶ストック溶液、毎日新しく調製) と共に  
3.0 ml で 2 ~ 3 分間手動インキュベートする。トリス-H  
Cl 緩衝液も使用し得るが、その場合は活性が約 2.5 %  
低下する。次いでアッセイを、スクランブルリボヌクレア  
ーゼの 1.0 μl アリコート (1.0 ml 桶溶液中 0.5 mg/ml  
ストック溶液、毎日新しく調製) の添加により開始  
し、インキュベーション混合物を 3.0 ml に維持する。より  
小さい規模で操作する場合は、前述の量を 1/10 に減少  
して、最終アッセイ量を 1.00 μl とし得る。1.0 μl ア  
リコートを 0.1 分の時点で採取し、その後 2 ~ 3 分間隔  
で 1.0 分まで採取して、スクランブルリボヌクレアーゼの  
活性化についてアッセイする。各アリコートは、3.0 ml  
で予め平衡化した石英キルベット内で、0.2 ml の  
高濃度に重合した酵母 RNA (5.0 μl の 5 mg/ml 桶  
ストック溶液) を含む 3.0 ml の水酸化ナトリウム (3.0 ml 桶  
トリス-HCl 緩衝液、pH 7.0, 5.0 mM KCl, 5 mM  
MgCl<sub>2</sub>) のアッセイ混合物に加え、P.D.T.

カルボニルイミン-356分光光度計(バンド幅2.5nm)のデュアル波長モードを用いてリボヌクレアーゼ活性を3.0%でもニクーし、 $A_{260}$ (ΔA)に対する $A_{356}$ の変化を測定する。RNA加水分解速度( $\Delta A \text{ 分}^{-1}$ )は1.5~2分にわたって一定である。この速度に対してインキュベーションからのアリコートの採取時間(=time = 0 minutes)の経過時間の勾配( $\Delta A \text{ 分}^{-1} \text{ 分}^{-1}$ )を三つ組みアッセイの線形回帰分析で計算し(相関係数は決まっておらず、9.9である)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の測定値とする。

シナオトシイトールのみによるスクランブルリボヌクレアーゼの非酵素的再活性化の研究を測定するため、酵素試料を省略して対照インキュベーションを実験する。これらの速度は通常 $0.2 \times 10^{-1} \mu\text{M A分}^{-1} \text{ 分}^{-1}$ であり、酵素試料のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性の計算で差し引かれる。

I単位のタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ活性は、リボヌクレアーゼ単位/分の速度でスクランブルリボヌクレアーゼの再活性化を检测する量であると定義される。

リボヌクレアーゼ単位は、1吸収(cadsorbance)単位/分の $A_{260}$ に対する $A_{356}$ の変化を生じる量であると定義される。

### 実験例 8

#### 酵母LYS 2株はURA3座にP.D1.発現カセットを導入したためのベクターの構造

LYS 2での組込みのためのベクターを下記の手順で構築した。プラスミドpUC-NotをHindIIIで消化し、無性ベクターフラグメントをゲル精製した。次いでこのフラグメントをEcoRIで消化し、得られた2.7kbのEcoRI-HindIIIベクターフラグメントをゲル精製した。精製フラグメントを下記の合成オリゴヌクレオチドと連結した：

5'-GATTCGGCCCGGCCGCTGCCTGGCGCCGC-3' (配列番号：6)

3'-CCCGCCGGTTCGAAACGGCGCGCTGAA-5' (配列番号：7)

該オリゴヌクレオチドは、EcoRI付着末端と、NotI部位と、HindIII部位と、NotI部位と、HindIII付着末端とをこの順序で含む。得られたプラスミドpUC-Notは、両端でNotI部位に直接フランギングされた单一のHindIII部位を含む。

URA3座に組込むべき発現カセットのターダゲッティングのためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母Lys2株遺伝子源は、YR9510に由来する1.1kbのU

RA41.1フラグメントであった [Parent, S., A., 1988, Yeast, 1, pp. 82-183]。プラスミドpUC-NotをHindIIIで消化し、子ウシ臍アルカリヌクレオチドで脱リン酸化し、1.1kbのHindIII-URA3フラグメントと連結して、プラスミドpUC-Not-URA3を得た。

LYS 2菌への発現カセットの導込みをターゲッティングするためのプラスミドを下記の手順で構築した。酵母LYS 2遺伝子を有するプラスミドY1p600 [Barrett, D. A. 及び Turner, J., 1986, Mol. Cell. Biol., 6, pp. 2828-2838]をEcoRI及びHindIIIで消化し、LYS 2遺伝子を有する4.5kbのEcoRI-HindIIIフラグメントを、予めEcoRI及びHindIIIで消化したpUC19にクローニングした。次いでこのプラスミドをPvuII及びBglIIで消化し、LYS 2遺伝子を有する3.7kbのPvuII-BglIIフラグメントをゲル精製し、末端末端化した。プラスミドpUC-NotをHindIIIで消化し、子ウシ臍アルカリヌクレオチドで脱リン酸化し、3.7

特表平2-508881 (18)

R D P の L Y S 2 フラグメントと連結した。所期の構造を有する得られたプラスミドを p U C - N o t - L Y S 2 (p N L とも称する) で消化した。

L Y S 2 での組込みのための第二のベクターも構築した。プラスミド T 1 p 6 0 0 を N o t I で消化し、L Y S 2 タンパク質コードィング配列の大部を含む 3. 0 k b p の N o t I フラグメントをゲル精製し、平滑 (S t r u c t u r e) 来消化した。プラスミド p U C 1 3 を B a m H I で消化し、平滑来消化し、3. 0 k b p の L Y S 2 フラグメントと連結して、組込みベクター p U C 1 3 - L Y S 2 を得た。

実験例 9

酵母アルファ因子分泌リーダーに融合したヒトPDIを過剰発生する酵母株の構造

ヒトPDIコードィング配列標本、P i t h i a j a n i e m i G (1987, 著者引用文献) によって記載されている複数部分的 cDNA クローン、p Z 1 0 及び p l 1 であつた。ヒトPDI cDNA の 5' 末端を有する p Z 1 0 に由来する 0. 45 k b p の E c o R I - P s t I フラグメントを p U C 1 3 にクローニングして、プラスミド p U K

消化した。その結果得られた、成熟ヒトPDIコードィング配列を有する 1. 9 k b p の H i n d I I - H i n d I I フラグメントをゲル精製し、平滑 S t r u c t u r e 及び H i n d I I で消化したプラスミド p G S 4 にサブクローニングした (p G S 4 はアルファ複合因子 (M F α 1 ) プレプロ分泌リーダー配列に融合した酵母 G A L 1 プロモーターを有する; Shaw, K. J. S., 1988, DNA, 1 1 7 - 1 2 6)。平滑来消化 S t r u c t u r e 及び H i n d I I 末端の間に形成された結合部は、M F α 1 プレプロリーダー配列とヒトPDI成熟部分との間の正確なインフレーム融合を構築する (得られたプラスミドは p U K C 1 6 1 と命名した) (第 4 図)。

L Y S 2 組込みベクター p N L (p U C - N o t I - L Y S 2 ) を S t r u c t u r e 及び X h o I で消化し、T 4 DNA ポリメターゼでの処理によって平滑来消化した。プラスミド p U K C 1 6 1 を E c o R I 及び H i n d I I で消化し、その結果得られ、G A L 1 0 プロモーター - アルファ因子プレプロリーダー - ヒトPDI成熟カセットを有する 2. 8 k b p の E c o R I - H i n d I I フラグメントをゲル精製し、T 4 DNA ポリメターゼでの処理

C 1 5 0 を得た。次いで該プラスミド p U K C 1 5 0 を E c o R I 及び A v a I で消化した (A v a I は成熟ヒトPDIをコードする配列の第三のアミノ酸に対応する位置で切断する)。得られた 3. 1 k b p のベクター並鎖 (b a c k b o r e) フラグメントをゲル精製し、下記の構造のオリゴヌクレオチドアグリマーと連結した：

5'-AATTCGTTGACGGCC-3' (配列番号：8)

3'-GGCACTCGGGGGCGCT-5' (配列番号：9)

該アグリマーは成熟ヒトPDIコードィング配列の 5' 末端を再構成し、合成の分泌リーダー配列への成熟ヒトPDI配列の正確な融合を可能にするような位置に H i n d I I 末端を含む。

次いで、得られたプラスミド p U K C 1 5 0 を P s t I で消化し、子タウニ酸アルカリホスファターゼで処理し、ヒトPDIコードィング配列の残部を有するプラスミド p I (P i t h i a j a n i e m i G, 1987, 著者参考文献) に由来する 1. 5 k b p の P s t I - P s t I フラグメントに連結して、プラスミド p U K C 1 6 0 を得た。このプラスミド p U K C 1 6 0 を H i n d I I (前記オリゴアグリマー内で切断する) で消化し、次いで H i n d I I で

によって平滑来消化した。前記平滑来消化や替りベクター フラグメントと該先端カセットフラグメントを互いに連結し、該連続混合物を用いて既、E c o R I 標 A T C C - 3 5 6 9 1 を形質転換した。所期の構造を有するプラスミドを含むものについて形質転換体をスクリーニングし、得られたプラスミド p N L - M F α 1 - h P D I を多量に製造した。p N L - M F α 1 - h P D I を N o t I で消化すると、両端で L Y S 2 cDNA 配列にフランキングされた 6. 2 k b p の発現カセットが得られる。消化したDNAを用いて、スクロープラスト法で (H i l a n e n, A. S., 1 9 7 8, Proc. Natl. Acad. Sci., U S A, 7 5, pp. 1 9 2 9 - 1 9 3 3) 、S. G. E. S. Y i e l i a n d B. J. L o r d 及び T R Y 1 8 8 を形質転換した。N o t I 斷端はターゲッティングデバイスとして作用しながら発現カセットを黄色素 L Y S 2 座に向かわせ、該座で断端カセットが相同相換元を介して組込まれた。形質転換体を、アルファアミノジビン整合寄因体培地で増殖するものについてスクリーニングした (C a s t i o n, B. B. G., 1 9 7 6, Genetics, 9 3, pp. 5 1 ; Barnes 及び Thorogood, 1 9 8 6, 著者引用文献)

参考文献）。このような増殖は、株が「ヨリ」であること意味する。LYS 2 プローブを用いて行ったクローン単離体のサンプルット分析で、発現カセットが LYS 2 座に組込まれたことが確認された。Fig. 1 I で消化した染色体 DNA 断片は、LYS 2 プローブとハイブリダイズするバンドについて、S. 0 から S. 8 & 9 への前段のサイズ変化を示した。その結果得られた、組込み発現カセットを含む BJ 1995 及び JRY 188 開運系を、それぞれ BJ 1995 / アルファ - HPD 1 及び JRY 188 / アルファ - HPD 1 (株 # 1072A) と命名した。

第10例

Tを過渡状態にする勝手株の構造

PDI - cDNA クローン p1 (PDI-1 α Januszewski ら, 1987, 加田引用文献) を PstI で消化し、ヒト PDI - cDNA の 3' 領域を有する 1. 8 kbp の PstI - PstI フラグメントをゲル精製した。次いで該フラグメントを pURKC150 (自己実験例 9 参照) の ClaI 領位に挿入してプラスミド pURKC151 を得

製した。

pUC19を SacR I 及び BamH I で消化し、2.7 kb p のベクターフラグメントをデル探査した。下記のオサガスクレオチドを合成した：



特製平7-508881 (20)

た。該プラスミドは、完全な全長ヒトPDI cDNAを含んでいる。該UKC151をHindIIIで消化し、適当なオリゴヌクレオチドアダプター（EcoRI認識配列を含む）と連結して、PDI cDNAの5'末端に位置するHindIII部位をEcoRI部位に交換した。得られたプラスミドpUKC153は、2.1kb pのEcoRIフラグメント上の完全ヒトPDIコードィング配列を含んでいる。該プラスミドpUKC153をEcoRI及びPstIで消化した。その結果得られた、ヒトPDI配列の5'部分及び3'部分をそれぞれ有する0.47kb pのEcoRI-PstIフラグメント及び1.7kb pのPstI-EcoRIフラグメントをゲル精製した。pUC19をEcoRI及びPstIで消化し、2.7kb pのベクターフラグメントをゲル精製し、改めて前述の0.47kb pのEcoRI-PstIフラグメントに連結した。該連結複合物を用いてE. coli AATCC35691を形質転換した。形質の構造を有するプラスミドを含む形質転換体からプラスミドDNAを製造した。該DNAをAvrII及びPstIで消化し、ヒトPDI配列の5'部分を有する0.38kb フラグメントをゲル精

オリゴメクレオチド #15165-220 及び 15166-240 をキテーを処理し、次いでそれぞれオリゴメクレオチド #15165-221 及び 15165-250 をアミニングした。ヒト PDI シグナルペプチド配列を有するヒト PDI を再構成するために、下記の連結を行った。  
pUC19' - 2.7kb p BamH I - EcoR I フラグメントを 1.7kb p PstI - EcoR I HPDI 8' フラグメント、0.38kb p PstI - ApaI 5' + hPDI フラグメント、並びにアミニングしたリンカ - 15165-220 及び 15165-221 を連結した。

既存 P.D.I シグナル配列を有するヒト P.D.I を苦情端子  
するため、下記の連結酵素物質形成した： pUC19-2.  
7 kbp BamH I - EcoR I フラグメントを 1.7  
kbp PstI - EcoR I - hPDI3' フラグメン  
ト、0.38 kbp PstI - AvaI 5' - hPDI  
I フラグメント、並びにアーニングしたランカー 151  
65-249及び 15165-250と連結した。〈アニ  
ーリングしたランカーは BamH I 及び AvaI 「持続末端  
を含み、指示されたシグナルペプチド切断及断腺部 5' 非

翻訳リーダー配列をコードする)。

連鎖複合物を包む、C-12 ATCC 33691中に形質転換し、形質転換体を、所用の構造を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。オリゴタクレオチドリンクーとフランкиングDNAとを含む領域にわたって延びるDNA配列を、ジデオキシン配列決定法で確認した。酵母PD1シグナルペプチド又はヒトPD1シグナルペプチドを含むレトPD1コードティング配列を、それぞれαSP-hPD1及びhSP-hPD1と命名した。これらのカセットを含むこのようにして得た二つのプラスミド(それぞれpUC-αSP-hPD1〔第6図〕及びpUC-hSP-hPD1)をSma I及びBam H Iで細化し、その結果得られた、SPD1カセットを有する1.5kbのフラグメントをゲル精製し、空港末端化した。

プラスミド pAD1 (赤外線吸収 H1 部位によって分離された GAT 1.0 プロモーター及び ADH1 基因ターミネーターを含む; 第 6 章) を E. coli K-12 で消化し、平滑末端化し、前述のカセットと連結して、それが再びプラスミド pGAL-γ SP-hPD1 及び pGAL-β SP-hPD1 を得た。これら二つのプラスミドを S. maltophilia の

對話 1

ヒト PD-1 又は酵母 PD-1 シグナルペプチドを用いるヒト  
PD-1 の C 末端 HDEL 疏水変異体を過剰発現する酵母株  
の構造

小胞体外に常在する酵母タンパク質は通常、小胞体内での保持のためのシグナルであるC末端KDELを含むアミノ酸配列を含む（Pellegriniら，1983，前出引用文献）。これに対し、ヒトPDIは、酵母内でのER保持に關しては余り導歴しないことが明るかにされた（Lewisら，1990，Cell，51，pp. 1359-1363）C末端KDEL配列（Fukuharaら，1987，前出引用文献）を有する。従って、C末端KDELがHDELに変化している改造ヒトPDIを構築することが求められた。これは下記の方法で達成された。

二つのプラスミド pUC- $\lambda$ SP-B PDI 及び pUC-B SP-B PDI (実施例 9) を EcoR I 及び XbaI で消化し、その結果得られた、ベクター配列と B PDI 配列の一部分を色付け、0.5 kbp の EcoR I - XbaI フラグメントと、B PDI コードオン配列の中間部分を色付け。5 kbp の XbaI - XbaI フラグメントと

特表平7-508881 (21)

（及びSca）で消化し、その結果得られた、GAL10  
p- $\alpha$ -ESP- $\alpha$ -PDI及GAL10p-ESP-PDI  
を発現カセットを有する3、2kbpのSmaI-SpI上  
のフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いでY  
S2組込みベクターリ $\lambda$ C13-1YS2のXbaI部位  
(平滑末端化した)に挿入した。得られたプラスミドを、  
それぞれp $\lambda$ YS2-ESP-PDI及p $\lambda$ YS2-  
ySP-PDIと命名した。

組込み形質転換のために、網田二つのプラスミドを B  
B I 及び S a c I で消化して、L Y S 2 プランギング末端  
 を有する線形フラグメントを形成し、該線形フラグメント  
 を用いて酵母株 B J 1 9 9 5 及び J R Y 1 8 8 を感受性株  
 とした。感受性の表現カセットを L Y S 2 に組込んだ形質転換  
 作を、ヨシ一 II で消化したゲノムDNAsのサザンプロット  
 によって同定し、次いで L Y S 2 プローブとハイブリダイ  
 ズした。得られた株は、B J 1 9 9 5 / h S P - h P D I 、  
 B J 1 9 9 5 / y S P - h P D I 、J R Y 1 8 8 / h S P  
 - h P D I (株 # 1 1 4 8 ) 及び J R Y 1 8 8 / y S P -  
 h P D I (株 # 1 1 5 7 ) であった。

をゲル精製した。次いで下記のオリゴヌクレオチドアダプターを合成した。

二つのオリゴのアニューリングに次いで、族アグロターを XbaI で消化し (EcoR I 及び XbaI 付着末端が得られる)、二つの別個の反応で、それぞれ S' -  $\alpha$  SP - bPDT 又は S' -  $\alpha$  SP - bPDT 配列を含む 4.0 kb の EcoR I - XbaI ベクターフラグメントと連結した。得られた二つのプラスミドを XbaI で消化し、bPDT コーディング配列の中間部分を含む前述の 0.5 kb の XbaI - XbaI フラグメントと連結し、ヒト PDI コーディング配列を再構築するために XbaI フラグ

## 特表平7-508881 (22)

メントが並んで万回で挿入されたプラスミド pUC-yS P-hPDI (HDEBL) 及び pUC-bSP-hPDI (HDEBL) を得た。これら二つのプラスミドを BamH I で消化し、発現カセットを有する二つの異なる 1. 5 k bp の BamH I 部位に挿入して、それぞれ pUC-GA 及 1.0 p-ySP-hPDI (HDEBL) 及び pUC-GA 及 1.0 p-bSP-hPDI (HDEBL) を得た。これら二つのプラスミドを SmaI, SphI 及び XbaI で消化した。得られた二つの 2. 5 k bp の SmaI-SphI 及 1.5 k bp の XbaI で消化しておいた pUC13-LYS2 を連結し、平滑末端化した。得られた二つのプラスミド pLYS2-ySP-hPDI (HDEBL) 及び pLYS2-bSP-hPDI (HDEBL) を HpaI 及び EcoRV の消化によって断続化し、次いで別個の反応で株 B J 1995 及び J RY 188 の形質転換液に使用した。LYS2 形質転換体を、アルファアミノアジピン酸会合蛋白体座地止で選択した。LYS2 位に組込んだ両重の発現カセットを含む導入体を、ゲノムDNA のサザンプロット分析によって

EcoRI フラグメントの両方と連結してプラスミド pUC-MFα1-hPDI (HDEBL) を得た。該プラスミドを BamH I で消化し、PDI カセットを有する 1. 5 k bp の BamH I-BamH I フラグメントをゲル精製し、プラスミド p403 (第 6 図) の BamH I 部位に挿入して、プラスミド pGAL-MFα1-hPDI (HDEBL) を得た。次いで該プラスミドを新規 XbaI, SphI 及び PvuI で消化し、その結果得られた、発現カセットを有する 2. 6 k bp の SmaI-SphI フラグメントをゲル精製し、平滑末端化した。pUC13-LYS2 ベクターを XbaI で消化し、平滑末端化し、次いで前述の 2. 6 k bp 平滑末端化フラグメントに連結した。得られたプラスミド pLYS2-MFα1-hPDI (HDEBL) を HpaI 及び EcoRV で消化し、新規 PDI ORF のアミノ酸 6~222 をコードする 0. 67 k bp の BamH I-EcoRV フラグメントをゲル精製し、下記の合成オリゴヌクレオチドアダプターと連結した：

5'-GATCCACAAACAAAGTTCCTCGG-3' (配列番号: 16)  
5'-GTTTGTGTTTACTTCAGAGAGGGCGG-3' (配列番号: 17)

### 実験例 1.2

单性アルファ因子分離リーダーを用いるヒトPDIのC末端HDEBL突然変異体を過剰発現する酵母株の構築

プラスミド pUKC16G (第 4 図) を BamH I 及び ClaI で消化し、アルファ因子プレプロリードー配列と hPDI の 5' -セグメントとを有する 0. 7 k bp の BamH I-ClaI フラグメントをゲル精製した。プラスミド pUC-ySP-hPDI (HDEBL) (実験例 1.1 に記載) を ClaI 及び EcoRI で消化し、C 末端 HDEBL 配列を有する hPDI の 3' セグメントを含む 0. 9 k bp の ClaI-EcoRI フラグメントをゲル精製した。pUC19 を BamH I 及び EcoRI で消化し、得られたベクターフラグメントを、0. 7 k bp の BamH I-ClaI フラグメント及び 0. 9 k bp の ClaI-

### LYS2 基の組込み発現カセットから酵母PDIタンパク質を過剰発現する酵母株の構築

完全酵母 P.D.I.1 遺伝子を有するプラスミド C7 (実験例 4 に記載) を EcoRV で消化し、酵母PDI 構成リード (CORF) の C 末端部分 (アミノ酸 223 から ORF の末端まで) と 3' ポリアデニリ酸配列とを含む 1. 8 k bp の EcoRV-EcoRV フラグメントをゲル精製し、プラスミド pAT103 (Twigg, A. G. 及び Herrington, D., 1980, Nature, 288, pp. 216-218) の EcoRV 部位に挿入して、pUK169 を得た。次いでプラスミド C7 を BamH I 及び EcoRV で消化し、新規 PDI ORF のアミノ酸 6~222 をコードする 0. 67 k bp の BamH I-EcoRV フラグメントをゲル精製し、下記の合成オリゴヌクレオチドアダプターと連結した：

5'-GATCCACAAACAAAGTTCCTCGG-3' (配列番号: 16)

5'-GTTTGTGTTTACTTCAGAGAGGGCGG-3' (配列番号: 17)

### 実験例 1.3

### 第7-508831 (23)

コードする。(ATG開始コドンは下線で示されている)。得られた①、7 kbpのBamH-I-EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いで、予めEcoRV及びBamH-Iで消化しておいたpUC17Sにサブクローンングして、プラスミドpUKC17Sを得た。

プラスミドpUKC169をEcoRVで消化し、その結果得られた、酵母PDIの断片C末端部分を有する1、9 kbpのEcoRV-EcoRVフラグメントをゲル精製し、次いでpUKC17Sの終反復EcoRV部位に挿入し、それによって無傷の(完全な)酵母PDI(yPDI)遺伝子を再生した。このようにして得たプラスミドをpUKC17Sと命名した。

pUKC17SをEcoN Iで消化し、yPDI遺伝子を有する得られた2、1 kbpフラグメントを平滑末端化し、ゲル精製した。pUC19をSacI及びSmaIで消化し、平滑末端化し、前記平滑末端化EcoN I-yPDIフラグメントと連結した。既述培養母物を用いて且、lacZ-DH5細胞を形質転換し、得られた形質転換体を、pUC19オリジンマー内のBamH-I部位がyPDIコードティング配列のS'末端に隣接して配置されるよう

に適当な方向でyPDI挿入体を有するプラスミドを含むものについてスクリーニングした。lacZN(フラグメント上のyPDI-ORFのS'末端にはあるBamH-I部位が既に存在していたため、成績物(pUC19-yPDIと命名)はこの時点では、1、9 kbpのBamH-Iフラグメント上にyPDI-ORFを含む。pUC19-yPDIをBamH-Iで消化し、yPDI遺伝子を有する1、9-BamH-I-kbpフラグメントをゲル精製し、次いでベクター-pUC19-GAL10p(B)-ADH1t(ストック#492)(第6図)のBamH-I部位にサブクローンングした。得られたプラスミドpUC19-GAL10p-yPDI-ADH1tをSmaI、SphI及びSacIで消化し、発現カセットを有する2、7 kbpのSmaI-SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、次いでpUKC17S(pUKC17Sは、予めEcoR I及びHindIIIで消化しておいたpUC19にサブクローンングしたY1p600(Barnes及びThornewell, 1986, 前出引用文献)の4、5 k-EcoRI-

HindIII-LYS2フラグメントを含む)の終反復SphI部位にクローニングした。得られたpUKC171-GAL10p-yPDIベクターをEcoR I及びPvuIIで消化してLYS2-GAL10p-yPDI-ADH1t-LYS2カセットを切離し、これを用いてLysogeny系を株JRY188及びB1995を形質転換した。得られたLYS2形質転換体を、実験例9に記載のように、ゲノムDNA粗製物のサザンプロットにより評価した。LYS2座に組込まれたGAL10p-yPDIカセットを有する各株の異構体が検出された。得られた株をBJ1995/yPDI及びJRY188/yPDI(株#1152)と命名した。

#### 実験例 14

##### URA3座からの組込み発現カセットから酵母PDIを誘導する酵母株の構築

プラスミドpUC-Not-URA3(実験例8)を且SalI及びNcoIで消化し(URA3遺伝子の一部分を欠失させるため)、平滑末端化した。プラスミドpUC18-GAL10p-yPDI-ADH1tをEcoR I、

SacI及びSphIで消化し、GAL10p-yPDI-ADH1t発現カセットを有する2、8 kbpのEcoR I-SphIフラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、前記ベクターフラグメントと連結して、プラスミドpNU-GAL10p-yPDIからURA3-GAL10p-yPDI-ADH1t-URA3組込みカセットを切り出した。得られた複数フラグメントを用いて酵母株KHY107を形質転換した。5-フルオロ-オホト酸含有固体培地上で(Bocke et al., 1984, Mol. Gen. Genet., 197, p. 546)、ura+形質転換体を選択した。得られたura+形質転換体に由来するゲノムDNAをEcoIで消化し、GAL10p-yPDI-ADH1tカセット由来の放射能標識したEcoI-R1-PvuIIフラグメントをプローブとして且いて、サザンプロットにより評価した。所産のGAL10p-yPDI-ADH1t発現カセットをURA3に組込まれた單體体が同定された。单體体K-Y1は、URA3に組込まれた複数のコピーを有していた(株#1138)。单體体K-Y3は、URA3に組込まれたコピーを一つだけ

## 特表平7-508881 (24)

育していた(株#1137)。

### 実験例 1.5

#### 細胞内培養内の P.D.I タンパク質の説明

酵母株を、 $3 \times YEPD$  の液体培地で、 $23^{\circ}\text{C}$  で 24 時間増殖させた。24時間が経過した後、培養物にガラクトースを最終濃度 4~6%まで加えた。次いで培養物を $23^{\circ}\text{C}$  で更に 24 時間再インキュベートした。あるいは、酵母株を $3 \times YEPD$  で $30^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養した。細胞を回収し、無菌冷水で洗浄し、同量の $3 \times YEPD$  + ガラクトース培地に再懸滴させた。酵母株を更に $26\sim28$  時間インキュベートし、その後回収し、タンパク質を抽出方法 2(下記)で抽出した。

#### タンパク質の抽出:

本質的に Meijer らの方法(1983, Gene, 24, p. 1~14)に従い、ガラスビーズ破壊法を用いて、指数増殖相位又は定常期細胞からタンパク質を抽出した。

方法 1: 26~28 時間後破壊法(日立, 0 中の PMS F (0.5 mM) の存在下で細胞壁のガラスビーズ破壊を

行い、次いで薄紙一層法サイクルにかけてタンパク質を抽出し、 $13,000 \text{ r.p.m}$  で 10 分間の遠心分離により可溶性タンパク質を回収した。PBG(固体)、硫酸アンモニウム(0~80%)又は紫外線遮蔽( $<100 \text{ kDa}$ )での濾過の後又は後で、溶離培養液の分離により最初に分離を終了した。タンパク質濃度は Bradford の方法(1976, Anal. Biochem., 72, pp. 248~254)で測定した。

方法 2: 方法 1 に従って、但し培養培地に N-methyl-D-glucoside 及び  $\beta$ -メチルカブトロタノール(それぞれ最終濃度 0.2 M 及び 1%で)加え、水上に約 10 分間放置し、その後 SDS を最終濃度 8%で加えて、細胞内試料を調製した。水上で 30 分間振搗した後、遠心分離によってタンパク質を回収し、冷アセトンで洗浄し、SDS-PAGE ローディング量面積に再懸滴させた。

5.0  $\mu\text{g}$  の全可溶性タンパク質を、本質的に Schulz らの方法(1987, Gene, 54, p. 118~123)に従って、一次元 SDS-PAGE(12%ボリアクリルアミド)とクーマシープルーカセキで分析した。

次の条件で電気泳動を実施した: 10% SDS-ポリア

クリルアミドゲル及びリーン当たり 1.0  $\mu\text{g}$  のローディングされたタンパク質(タンパク質抽出方法 1)。既てのゲル中で Sigma 予備染色分子量標準を使用した。ゲルは Bio-Rad mini-Protean II ゲルシステムで操作した。タンパク質濃度を計算せば、細胞外抽出物をリーン当たり 1.5~2.0  $\mu\text{g}$  でローディングした。電気泳動の途中、電圧は 200 ボルト以下に維持した。

Biometra 培養槽用エスタンプロットシステムを用いて、タンパク質をニトロセルロースにトランスファーした。ニトロセルロース膜を 5% (w/v) 酵母エキス培地で 8 時間から一晩にわたり、或ヒト P.D.I ポリクロマチル抗体と共にインキュベートした。膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG を最終希釈度 1:100 で加え、インキュベーションを 1 時間施行した。洗浄後、Amersham ECL キットを製造業者の指示通りに使用して、プロットを発色した。

最初のアッセイでは、株#072A が分離した P.D.I をウエスタンプロットで検出できるレベルで產生することが示明した。使用した ECL プロトコルでは、検出レベルは 0.

0.5  $\mu\text{g}$  の精製ウシ P.D.I であった。この分離 P.D.I は、 $100 \text{ kDa}$  カットオフ紫外線遮蔽によって保持されたため、二量体であることが判明した。株#072A と対応する H.D.E. も酵母株(1279)とを比較すると、ヒト P.D.I は双方から分離されていた。この実験では、最適培養/培養条件を、培養温度(°C)及び培養期間について最適化した。前記二つの株は、 $23^{\circ}\text{C}$  で培養し次いで $26^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養するか、又は $30^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養し培養すると、より高い P.D.I 合成レベルを示した。

### 実験例 1.6

#### 酵母内でアンチスクシンを表現させためのベクターの開発

アンチスクシンは血液凝固因子 Xa の強力なタンパク質阻害物質である。アンチスクシン(ATS)は、メキシコヒル *H. laementaria officinalis* の葉茎から単離された(Mutti, B. G., 1988, J. Biol. Chem., 263, p. 10162~10163)。その後、ATS をコードする cDNA が Han, J. H. により単離され、構造が解明された(1989,

(配列番号: 18)

Gene, 15, pp. 47-57)。ATSは、粗挽元酵母によって分離された異種タンパク質中の折り畳み及び構造をジスルフィド結合の形成に対する測定レベルの PDI 反応の影響を評価する上で理想的なリポータータンパク質である。なぜなら ATSは、タンパク質が生物学的活性を有するようにするために正確な対を形成しなければならない 10 個のジスルフィド結合を有するからである。

発現ベクター pK H 4 × 2 (Jacobson, M. A. ら, 1989, Gene, 85, pp. 511-516) を用いて、酵母内で ATS を表現させた。前記ベクターは、ガラクトース誘導性 GAL 10 プロモーターと、異種タンパク質の分離を制御するための酵母 MFT 1 プレアプロ分離リーダー開示所とを含む。ATSをコードする配列は、クローン A 5 C-4 (Hann, J. H. ら, 前出引出文献) に由来するケブクローニングした ATS cDNA を基質として使用し且つ下記のオリゴタクレオチドプライマーを用いて、ホリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で単離した。

1. 5'-ATATGGATCCCTGCTTTGGATAAAAGACAGGAGCATTGGAC  
CCCCGTGT-3' (配列番号: 18)

2. 5'-TCTAACGATCCCTATGATTAACCGTCGGATTAAGCTT-3'

これらのプライマーは両方とも、PCR 産物のサブクリーニングを容易にするために Bam H I 部位を含む。第一のプライマーは、酵母 K H 4 × 2 の 5' 端を、成熟 ATS の第一ミノ酸残基に挿入する (酵母 y s c D モンドプロテアーゼは該配列中の Lys - Arg 部位の C 末端側で開裂する)。PCR 産物を Bam H I で消化し、ゲル複製し、次いで Bam H I 消化 pK H 4 × 2 に連絡して、pK H 4 × 2 / ATS (K 9 9 1) (第 8 図) を得た。次いでこの発現ベクターを用いて、スフェロプラスチド (Hinnan ら, 1978, 同上引出文献) で、表 1 に示す酵母細胞株を形質転換した。

ロイシンを含まない合成培养液地 (Schaubitz, L. S., 1987; Gene, 61, pp. 123-133) 上で形質転換体を選択し、クローン单離体についてストライクし、これらの離離体を後続の分析で使用した。株は、1.7% グリセロール含有合成培地中で -70°C で貯蔵することにより保存した。

## 実施例 1.7

## アンチスクランの分離に関する結果及び PDI 活動活性の指標及び参考

K 9 9 1 形質転換株 J R Y 1 8 8 株を、酵母もしくはヒト PDI を過剰産生する種々の形質転換株体とを、下記の方法でアンチスクランの分離に関する評価した。指示された株を -70°C 冷凍グリセロールストックからロイシン無含有合成寒天プレート上にストライクし、30°C で 3 日間増殖をせた。5 ml の 3 x Y E HD (60 g Difco の酵母抽出物、3.0 g Hy So ベブトン、4.8 g グルコース / l ) 培地を入れた培養管 (18 × 150 mm) に小ループ一杯の細胞を接種し、延縦培養ローラー (ラム) 上で 23°C で約 18 時間インキュベートした。この段階で、ガラクトースを最終濃度 4.8% (w/v) を加えて細胞を誘導し、培養物を 23°C で更に 15 回回転インキュベートした。次いで、遠心分離で細胞を回収し、清濁化を地上清をアンチスクラン活性のアッセイのために保持し、活性を因子 Xa 活性の測定によって測定した (Nuttall, B. R., 1968, 前出引出文献)。該実験は三つ組みで実施した。結果を要約して表 2 に示す。

形質転換株	宿主株	元の株	PDI + クローン
990	239	JRY166	なし
1105	1072A	JRY166	アルファ-hPDI
1176	1157	JRY166	ySP-hPDI
1275	1148	JRY166	HST-hPDI
1293	1279	JRY166	alpha-hPDI (HDEL)
1294	1267	JRY166	beta-hPDI (HDEL)
1295	1268	JRY166	gamma-hPDI (HDEL)
1177	1252	JRY166	yPDI
1156	948	KEY107	なし
1154	1336	KEY107	yPDI-A1
1155	1137	KEY107	yPDI-A2

\* PDI カセット及び株は次のように実施例に記述されている: アルファーカ PDI、実施例 9 : ySP-hPDI 及び ySP-hPDI、実施例 10 : hSP-hPDI (HDEL) 及び ySP-hPDI (HDEL)、実施例 11 : yPDI (HDEL) 及び ySP-hPDI (HDEL)、実施例 12 : yPDI、実施例 13 : yPDI-A1 及び yPDI-A2、実施例 14。

\* 形質転換株は K 9 9 1 アンチスクラン発現ベクターを含む。

表2

株	ATS/L. 9 OD	相対レベル
JRY188	23.6	1.0
JRY188/hSP-hPDI	24.6	0.95
JRY188/ySP-hPDI	28.4	1.11
JRY188/alpha-hPDI	27.2	0.9
JRY188/yPDI	65.1	2.55

## 実験例 1.8

JRY188及びHDBL失活酵母細胞ヒトPDIを過剰産生する酵母株によるアンチスクラン分認の評価

K991形質転換JRY188と、三つの異なる分認リードーを有するHDBL失活酵母細胞ヒトPDIを過剰産生する酵母細胞株とを実験例1.7に記載のように増殖し、清浄化培地上清を、実験例1.7に記載のように因子X-a 抗原アッセイで分認ATSレベルについて評価した。結果は表3に示す。

表2

株	ATS/L. 9 OD	相対レベル
JRY188	18.0	1.0
JRY188/hSP-hPDI(HDBL)	27.5	1.53
JRY188/ySP-hPDI(HDBL)	29.3	1.63
JRY188/alpha-hPDI(HDBL)	23.3	1.24

## 実験例 1.9

酵母株KHY107及び母PDIを過剰産生する酵母株によるアンチスクランの分認

K991形質転換KHY107と、酵母PDIを過剰産生する該株の形質転換酵母株とを増殖し、清浄化培地上清を、実験例1.7に記載のように因子X-a 抗原アッセイで分認ATSレベルについて評価した。結果は表4に要約して示す。

表4

株	ATS(mg/L)	ATS	ATS/ATR
KHY107 A1	0.314	23.9	0.013
KHY107 A2	0.244	24.5	0.010
KHY107 A3	0.334	25.0	0.013
K-Y1 A1	1.166	24.0	0.047
K-Y1 A2	1.449	21.0	0.067
K-Y1 A3	1.483	23.3	0.059
K-Y3 A1	0.856	29.0	0.099
K-Y3 A2	2.144	51.2	0.042
K-Y3 A3	1.929	49.0	0.049

K-Y1は、URA3に多重コピ-GAL4-yPDIを有するKHY107である。

K-Y3は、URA3に単一コピ-GAL4-yPDIを有するKHY107である。

A1、A2及びA3は、平行して評価した指示された株の種々のクローン單離体を示す。

酵母PDIの過剰発現の結果、单離株K-Y1-A1の場合、ATS活性の分認が粗細菌ドライバースで4倍に増加し、空堀ベースで約9倍の分認が観察される。

## 実験例 2.0

多重コピーブラスミドから酵母PDI上又はヒトPDIを過剰産生する酵母宿主株の構築

多箇コピー酵母シャトルベクターYEp24 (Bootsle et al., D. S., 1970, Gene, 8, pp. 17-24)は、酵母2ミクロンDNA複製起点と、ウラシル無含有合成培地で選択するための酵母URA3遺伝子を含む。YEp24をBamHIで消化し、得られた7.8kbのBamHIベクター・フラグメントをゲル精製した(フラグメントa)。プラスミドUC18-GAL10p-yPDI-ADH1( #1015)をEcoRI、SphI及びSalIで消化した。その結果得られた、EcoRI-SphI及びSalIでフラグメントをゲル精製した(フラグメントb)。プラスミドpMKC161

## 特実平7-508881 (27)

をEcoR I及びHind IIIで消化し、GAL1 p-MF α 1プロモーターヒトPDI発現カセットを有する2.8 kbpのEcoR I - Hind IIIフラグメントをゲル精製した(フラグメントc)。前記三つのフラグメントを平衡末塩化し、次いで下記の手順で互いに連結した:(1)ベクターフラグメントa及びフラグメントbを互いに連結してプラスミドYEP24-GAL1 10 p - γ PDI(第9図)を得る;(2)ベクターフラグメントa及びフラグメントcを互いに連結してプラスミドYEP24-GAL1 10 p-MF α - hPDI(第10図)を得る。得られた前記二つのプラスミドDNAの大規模C<sub>1</sub>C<sub>1</sub>競争を行った。二つの初回の形質転換反応で、酵母株JRY1 38を用いてS東京ベクターK 93(実験例26)及びYEP24-GAL1 10 p - γ PDIもしくはYEP24-GAL1 10 p-MF α - hPDIで陽性形質転換した。両方のプラスミドを含む形質転換体を、ロイシン及びウラシルの両方を欠失した合成培地で選択し、単離した酵母株(*single colony*)を同一培地上で再ストライクしてクローン単離体を確認した。二つの先の同時形質転換の各々について5回の前記クローン単離体を、培養管内の

5 mlの3×YPD培地に接種し、細胞培養ローラードラムで23℃で24時間インキュベートした。24時間が経過した後、ガラクトースを濃度4%、8%を加え、培養物を23℃で更に5日間インキュベートした。遠心分離によって細胞を回収し、清澄化培地上清を因子Xa阻害アセイでATS活性レベルについてアッセイした。YEP24-GAL1 10 p - γ PDIプラスミド及びATS発現ベクターを含む時形質転換体は、ATS発現ベクターのみを含む親JRY1 38株と比べると、単離体に対して2~2.8倍の分離ATS活性レベルを示した。YEP24-GAL1 10 p-MF α - hPDIプラスミド及びATS発現ベクターを含む時形質転換体は、ATS発現ベクターのみを含む親JRY1 38株と比べて、2~3倍の分離ATS活性レベルを示した。

### 実験例 2.1

酵母の複数タンパク質の発現に便用し同一発現ベクターから酵母又はヒトPDI上を過剰発生する酵母宿主株の構築及び評価

#### S. Preparation GAL1及びGAL1 10株

品字を、分歧型(divergent) GAL1及びGA1 10プロモーターとこれら二つのプロモーターのTATAルボックスの間に位置する共通GA1 10結合ドメインとを含む二つの構造遺伝子の間の接頭から分歧的に(divergently)切断した。プラスミドpBIM272(Johanson, M. 及び Davis, R., 1984, Mol. Cell. Biol., 4, pp. 1440)は、この分歧型酵母GAL1 - GAL1 10プロモーターを0.95 kbpのEcoR I - Hind IIIフラグメント上に含む(EcoR I 11 bp位に挿入した内部BamH I部位も有する)。このプロモーター-フラグメントを使用して、分歧型プロモーター-カセットベクターpUC-GAL1/GAL1 10を構築した。該ベクターは次の特徴を有する:赤唐草E. coli及びS. cerevisiaeにより、この順序で、酵母DH5 1転写タームネーター(0.95 kbp Hind III - BamH I フラグメント)から分離した酵母GAL1 10プロモーター。非反转BamH I及びHind III部位によりDH5 1転写タームネーターの第二のユビーから分離した酵母GAL1プロモーター。二つのDH5 1タームネーター-カルメントの3'末端部、分歧型プロモーター

発現カセット全体をSphIフラグメントとして単離できるように、SphI部位にあってアランキングされている。このプラスミド内のベクター三重体は、オリジンカーの代わりに前記発現カセットを有するpUC 18である。

プラスミドpUC-GAL1/GAL1 10をBamH Iで消化し、ゲル精製してフラグメント「a」を形成した。プラスミドpUC18-GAL1をBamH Iで消化し、成熟ヒトPDIコードィング配列にインフレーム融合したアルファ因子プロボリーザーを有する1.9 kbpのBamH Iフラグメントをゲル精製し、ベクターフラグメント'a'に連結して、プラスミドpUC-GAL1/GAL1 10-hPDIを得た。該プラスミドでは、アルファ因子プロボリーザーとヒトPDI融合がGAL1プロモーターの制御下にある。プラスミドpUC18-GAL1/GAL1 10カーネPDI - ADH1 t(実験例13)をBamH Iで消化し、その結果得られた、酵母PDIコードィング配列を有する1.7 kbpのBamH Iフラグメントをゲル精製し、次いでベクターフラグメント'a'に連結して、プラスミドpUC-GAL1/GAL1 10-γ PDIを得た。該プラスミドでは、GAL1プロモーターが酵母PDIの発現を制御する。このようにして得た二つのブ

特表平7-508881 (28)

プラスミドを E.coli R I で消化し、平滑末端化し、それぞれ h P D I 及び  $\gamma$  P D I カセットを有するベクターフラグメントを及びたを得た。

AT S 発現ベクター (K 991) を S.a L I 及び B.g I I で消化し、成熟 AT S のコードィング配列にインフレーム適合したアルファ 因子プロリードーを有する S.a L I - B.g I I フラグメントをゲル精製し、平滑末端化し、別個の反応で二つの平滑末端化ベクターフラグメントを及びて連絡した。制限地図で調べて正確な構造を有する得られたプラスミドを、それぞれ pUC - G A L 1 / 1 0 - h P D I / AT S (第 1 図) 及び pUC - G A L 1 / 1 0 -  $\gamma$  P D I / AT S (第 2 図) で消化した。これら二つのプラスミドを S.p h I で消化して発現カセットを遊離させ、h P D I 開運又は  $\gamma$  P D I 開運発現カセットを有するフラグメントを、平均 S.p h I で消化した酵母シトルベクター p C 1 / 1 (Rosenberg, S. L., 1984, Nature, 312, p. 77-80) と連絡した。その結果、二つのプラスミド、p C 1 / 1 - G A L 1 / 1 0 - h P D I / AT S 及び p C 1 / 1 - G A L 1 / 1 0 -  $\gamma$  P D I / AT S が得られた。これらのプラス

ミドでは、AT S 及び P D I 開運発現カセットが、それぞれ G A L 1 0 及び G A L 1 プロモーターの制御下で同一の高コピーレベルベクター上に存在していた。

次いでこれら二つの発現ベクターを用いて、酵母株 R Y 1 8 8、S J 1 9 9 5 及び他の適当な酵母宿主株を形成種接種した。形成種接種をヨイシン無着色培地上で選択し、得られた形成種接種体を、上記実験例に記載のように、AT S 及び P D I の発現／分泌について評価した。

表 5 (下記) に示す結果から明らかのように、h P D I を過剰発現する単離体は、p K H 4  $\alpha$  2 / AT S のみを含む对照株と比べて最高高いレベルのアンチスタシンを分泌する。また、酵母 P D I を過剰発現する単離体は、对照株と比べて 3 ~ 1 倍高いレベルのアンチスタシンを分泌した。

表 5

構成物	アンチスタシン (mg/L)*
<u>pC1/1-GAL1/10-hPDI/AT S</u>	
単離体 1	4.2
単離体 2	5.3
単離体 3	3.9
単離体 4	4.6
単離体 5	5.1
<u>pC1/1-GAL1/10-<math>\gamma</math>PDI/AT S</u>	
単離体 1	3.9
単離体 2	11.7
単離体 3	5.8
直上段落	
単離体 4	26.0
単離体 5	8.2
JAY109 無菌	4.5

\* 28°Cで培養後 5 日目の収率。

実験例 2.2

P D I 過剰発現単離体によるアンチスタシン分泌の増加に対する温度の効果

アンチスタシン発現ベクター p K H 4  $\alpha$  2 / AT S 及び Y E D 2 4 - G A L 1 p - M F  $\alpha$  - h P D I もしくは Y E p 2 4 - G A L 1 0  $\alpha$  -  $\gamma$  P D I で同時に形成種接種した株 R Y 1 8 8 の選択した単離体を、23°C 又は 30°Cでの増殖後にアンチスタシン分泌について評価した。アンチスタシン発現ベクターのみで形成種接種した株 R Y 1 8 8 を平行して増殖した。23°C 又は 30°C で一倍増殖した後、カラクタースを最終濃度 4, 8% で加えて細胞培養液を調整し、23°C 又は 30°C の適当な温度で更に 1 日間増殖した。培養後 3 ~ 6 日で採取した培養液を、四子 X 6 植物アッセイにより分泌アンチスタシンレベルについて評価した。表 6 の結果から明らかのように、アンチスタシン発現は、P D I を過剰発現する他の単離体について、培養後 3 日目及び 5 日目の両方で、温度を 30°C にした時よりも 23°C にした時の方が強かに大きかった。

## 表6

実験法	温度 (°C)	アンチスタンシン(%)	
		2-1	5-1
YPD1-1	20	0.83	2.11
YPD1-2	20	1.24	2.68
YPD1-3	20	5.93	10.25
YPD1-4	20	3.00	15.92
JRY189 無	20	0.38	0.65
YPD1-1	30	0.49	0.47
YPD1-2	30	0.42	0.47
YPD1-3	30	2.29	4.65
YPD1-4	30	2.71	2.16
JRY189 無	30	0.34	0.30

\* 両々の  $\Delta$  PDI 単離体は、アンチスタンシン強度ベクター-K9-1及びYEp24-GAL1p-MF $\alpha$ - $\Delta$  PDI の両方を含んでいた。YPD1 単離体は、ベクター-K9-1及びYEp24-GAL10p- $\Delta$  PDI の両方を含んでいた。

TAPをコードする合成遺伝子はインフレーム適合した真正(authentic) MF $\alpha$ 1プレプロリーダー配列を含む第二のTAP発現ベクター-pKH4-3B/TAPを構築した。合成TAP遺伝子を含むプラスミドpKH4-TAP (Neupertら, 1990, 前出引文)を、合成TAP遺伝子の5'末端及び3'末端をそれぞれ改変するために、下記の二つのオリゴヌクレオチドプライマー

5'-TACAGCGGC TGTGCACTAA-3' (配列番号: 20) 及び  
5'-ACTGGATCCG AATTCAACCT TAGATGCCAG CCT-3' (配列番号: 21)

を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で、DNA断片として使用した。

該PCR反応は、当著者に良く知られている方法 (Jones, M. A. ら編, 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA) で実施した。得られたPCR産物を74ボリヌクレオチドキーザーゼでリバース酸化し、BamH1で消化し、次いでゲル精製して、下

PDIを過剰発達する組換え酵母株によるマダニ抗凝血ペプチド (TAP) の分離

マダニ抗凝血ペプチド (TAP) は、血凝素因子Xaの強力な高選択性阻害物質である [Waxman, L. G., 1990, Science, 248, pp. 593-596]。TAPはマダニ *Oribatididae* から単離された新しいセリンプロテアーゼ阻害物質である。TAPは、6個のシステイン残基を含む69個のアミノ酸からなる (Waxman, L. G., 1990, 前出引文)。TAPは、ガラクトース結合性A1-10プロモーターを、TAPをコードする合成遺伝子にインフレーム適合した酵母用P $\alpha$ 1プレプロリーダー配列とを含む発現ベクター-pKH4-TAPを用いて、酵母内で発現された (Neupert, M. ら, 1990, J. Biol. Chem., 265, pp. 17746-17752)。このベクターは、プレプロリーダーのアミノ酸79の位置に配置された BamH1クローニング部位の存在に起因して、少し改変された Mf $\alpha$ 1プレプロリーダー配列を含む (Neupert ら, 1990, 前出引文)。

APコーディング配列の正確なる3'末端に單離末端を有し且つ熟続終止コドンの3'側に付着 BamH1末端を有する、0.12kbのプラント BamH1フラグメントを得た。

ベクター-pKH4-3B (Hofmann, K. 及び Schulitz, L. D., 1991, Gene, 101, p. 105-111) は、MF $\alpha$ 1プレプロリーダー-コーディング配列の3'末端に非反復 SphI部位を含む。pKH4-3Bを SphIで消化し、T4-DNAホリマラーゼで処理して单離末端化し、DigIで消化した。得られたプラント BamH1ベクターフラグメントをゲル精製し、前述の0.12kbのプラント-BamH1-TAPフラグメントに連結して、ベクター-pKH4-3B/TAPを得た。

別個の形質転換反応で、酵母株JRY1095、JRY188及びU9を、ベクターYEp24-GAL10p- $\Delta$  PDI及びpKH4-TAPもしくはpKH4-3B/TAPで同時形質転換した。両方のプラスミドを含む和形質転換体を、ロイシン及びウラシルの両方を欠失した合成培地上で選択し、単離した単離苗を同一培地上で再ストリ

ークして、クローン单载体を選択した。種々のベクター／宿主同時形質転換の各々について三つの前記クローン单载体を、培養管内の約mLの4%グルコース含有ウサシル欠失改質の $\lambda$ -Leu<sup>r</sup>宿地（ $\lambda$ -Leu<sup>r</sup>Uras<sup>r</sup>）に接種した。培養液を細胞培養ヨーラードラム内で30℃で24時間インキュベートした。24時間が経過した後、細胞を離心分離によって回収し、4%ガラクトースを含む5mLの $\lambda$ -Leu<sup>r</sup>Uras<sup>r</sup>培地に最肥育させた。得られた培養物を30℃で更に48時間インキュベートした。次いで細胞を離心分離によって回収し、精進化培地試料をS-C-X-HPLC又は因子Xa遮害アッセイにより分離TAPレベルについて評価した（Waxman et al., 1990, 前出引用文献）。別の方針として、粗換え酵母細胞を23℃で24時間増殖し、ガラクトースを最適濃度以外で加えることにより構築し、次いで30℃で更に5日間インキュベートした。次いで、精進化培地試料を前記のように分離TAPレベルについて評価した。

## 【配列】

配列番号：1

配列の長さ：6 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列  
Trp Cys Gly His Cys Lys  
1 5

配列番号：2

配列の長さ：4 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列  
His Asp Glu Leu  
1

配列番号：3

配列の長さ：6 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Trp Cys Gly Pro Cys Lys  
1 5

配列番号：4

配列の長さ：10 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Phe Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys  
1 5 10

配列番号：5

配列の長さ：30 基塩基

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CTTACAGTCG CCACACCGATG GAGGCTTCAA

30

配列番号：6

配列の長さ：26 基塩基

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AATTGGGGCC GCAAGCTTGC CGCCCGC

28

配列番号：7

配列の長さ：26 基塩基

配列の型：核酸

鎖の数 : 一本鎖	配列の種類 : c-DNA	
トポロジー : 直鎖状	配列	
配列の種類 : c-DNA	TCCGGGGGCGT CGACG	
配列	15	
ATGGGGGGG CGCGCTTTCG GGGGGG	26	配列番号 : 1.0
配列番号 : 3	配列の長さ : 15 塩基対	
配列の型 : 梱酸	配列の型 : 梱酸	
鎖の数 : 一本鎖	鎖の数 : 一本鎖	
トポロジー : 直鎖状	トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : c-DNA	配列の種類 : c-DNA	
配列	配列	
ATTGGTTGA CGGGCG	15	GATCGAGAA AGCAAAATGCG CGCGCGCGG CCGCGCGCGC 60 CGCGCGCGCG CGCG
配列番号 : 9	配列番号 : 1.1	
配列の長さ : 15 塩基対	配列の長さ : 7.3 塩基対	
配列の型 : 梱酸	配列の型 : 梱酸	
鎖の数 : 一本鎖	鎖の数 : 一本鎖	
トポロジー : 直鎖状	トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : c-DNA	配列の種類 : c-DNA	
配列	配列	
TCGGGGGGT CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG	40	TCGGGGGGT CGCGCGCG AGCGCGCGCG AGCGCGCGCG AGCGCGCGCG 60 AGCGCGCGCG AGCGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG
ATGGGGGGG CGCG	73	CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG
配列番号 : 1.2	配列番号 : 1.4	
配列の長さ : 8.8 塩基対	配列の長さ : 9.1 塩基対	
配列の型 : 梱酸	配列の型 : 梱酸	
鎖の数 : 一本鎖	鎖の数 : 一本鎖	
トポロジー : 直鎖状	トポロジー : 直鎖状	
配列の種類 : c-DNA	配列の種類 : c-DNA	
配列	配列	
CGGGCGAGA AGCAAGTGAA GTTTGCGCG CGCGCGCG TCGCGCGCG CGCGCGCG	60	CGGGCGAGA AGCAAGTGAA GTTTGCGCG CGCGCGCG TCGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG 60 AAACCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG
CGCGCGCG CGCGCGCG	98	CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG CGCGCGCG
配列番号 : 1.3	配列番号 : 1.5	
配列の長さ : 8.8 塩基対	配列の長さ : 8.8 塩基対	
配列の型 : 梱酸	配列の型 : 梱酸	

配列の長さ：9.5 基塩基

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

ANTTGGGATC CTTTACCTTC ATGGTGCGAC CGTTGCGGT CATGGCTTC  
CTGGCTATCT GCTCCGCGCT CGTTCGCGAG CGTGGGCGAG TCGTC30  
95

配列番号：1.6

配列の長さ：8.1 基塩基

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

GATCCACATA AGCAAACTGAAT GTTTCTGCCT C

31

配列番号：1.7

配列の長さ：8.1 基塩基

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

AGATGGATCC TCTCTTCTCA TAAAGAGAGA GCGGCGCTTG GCGCGCGCT T

32

配列番号：1.8

配列の長さ：8.4 基塩基

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

TATAGGATCC TTATGATATG CGTGGGATTA GCCT

33

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

ACTGGATCC AATTCAAGCT TAAATGCAAG CGT

33

配列番号：2.0

配列の長さ：2.0 基塩基

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c-DNA

配列

TCTAACCTC TGTGGATCAA

34

配列番号：2.1

配列の長さ：3.5 基塩基

配列の型：複数

鎖の数：一本鎖

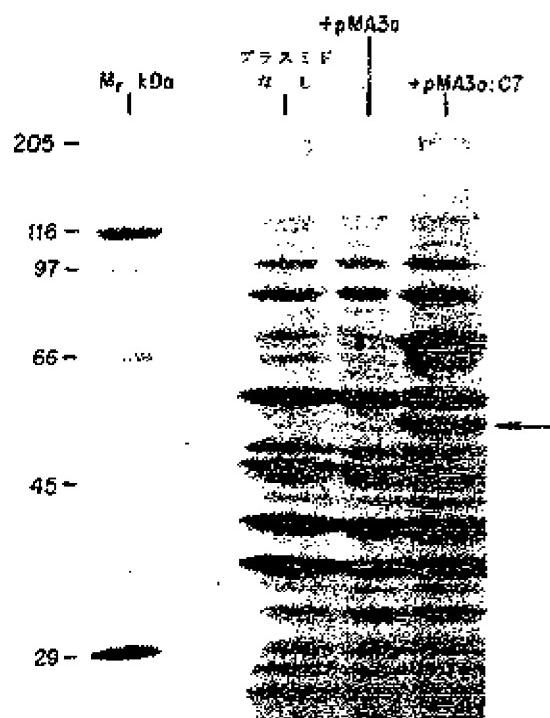


FIG. 1

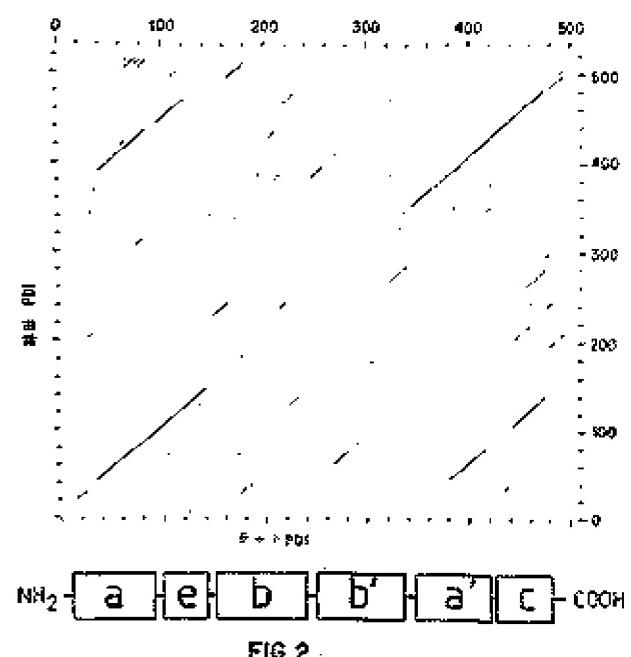


FIG. 2

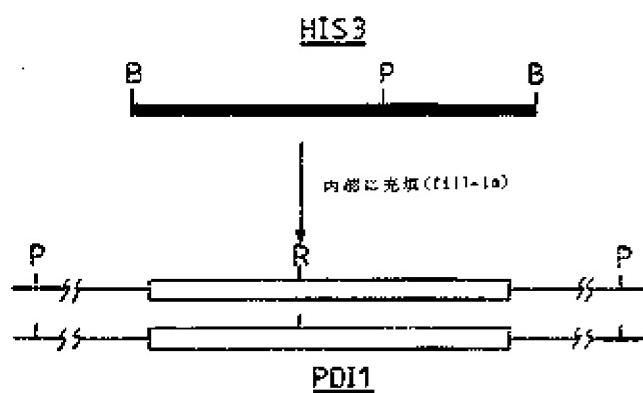


FIG. 3a



FIG. 3b

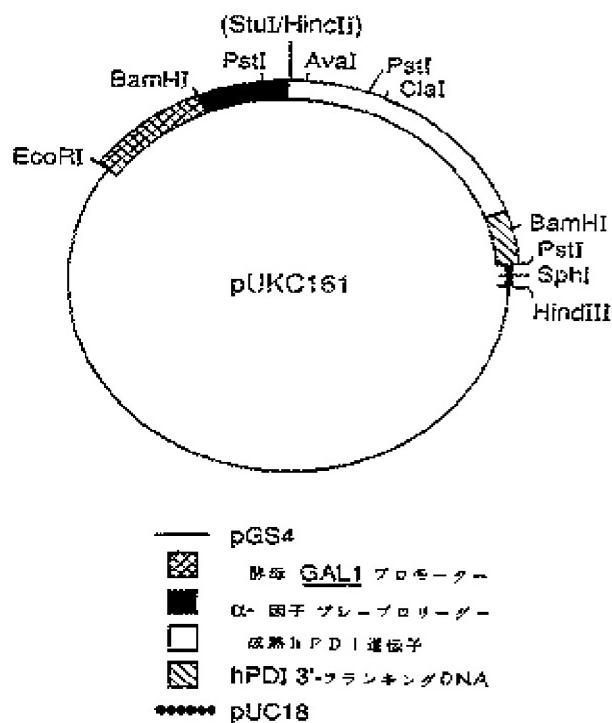


FIG. 4

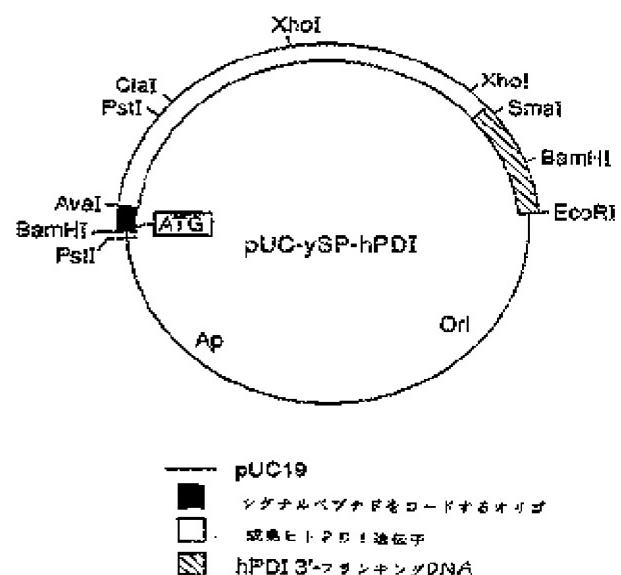


FIG. 5

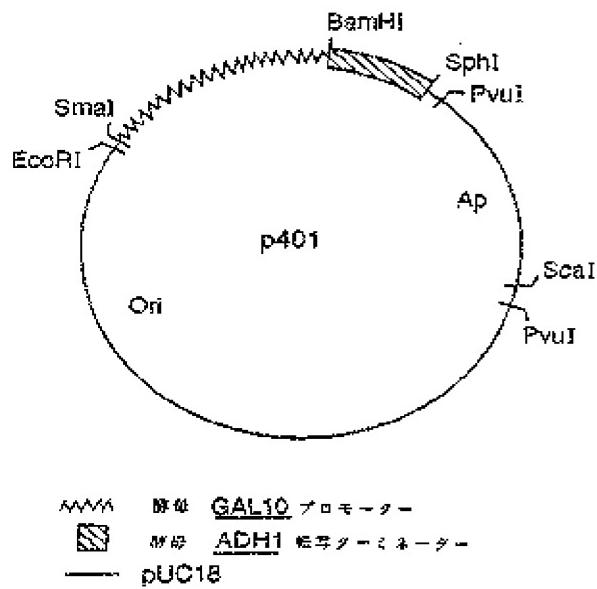


FIG. 6

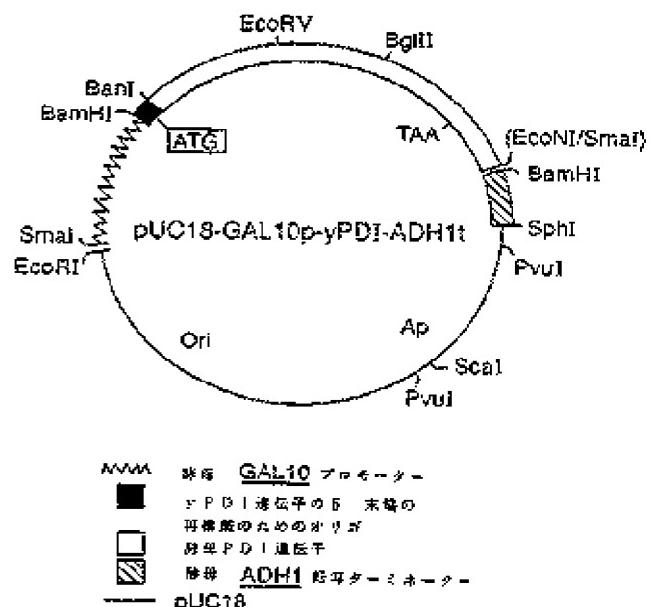


FIG. 7

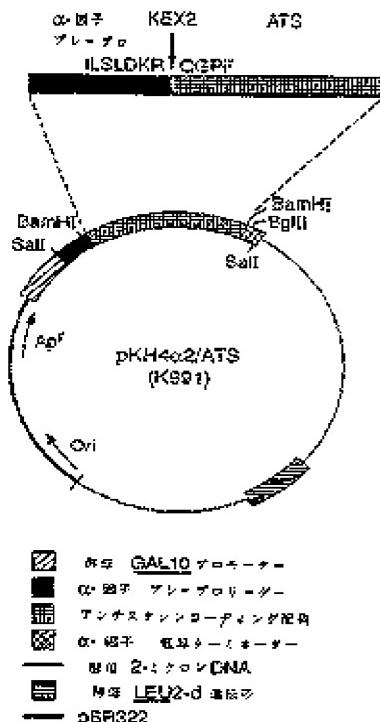


FIG. 8

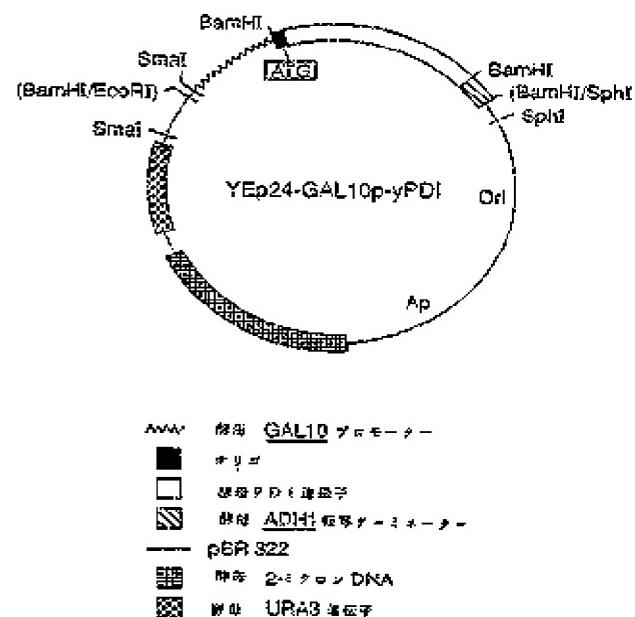


FIG. 9

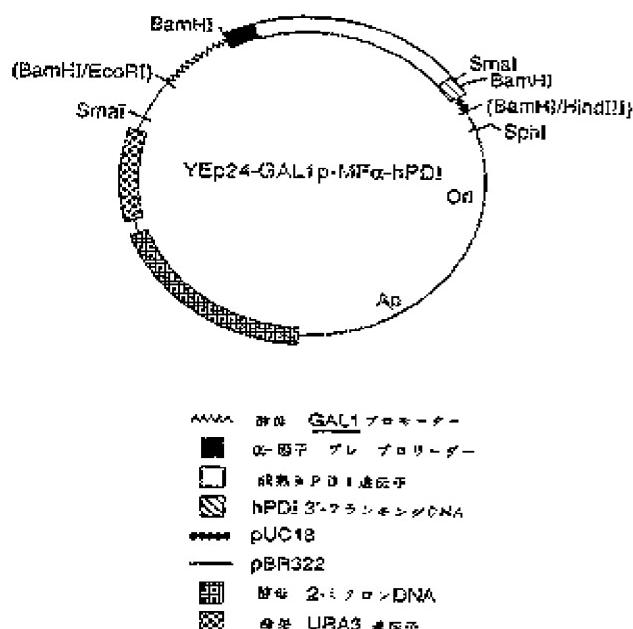


FIG. 10

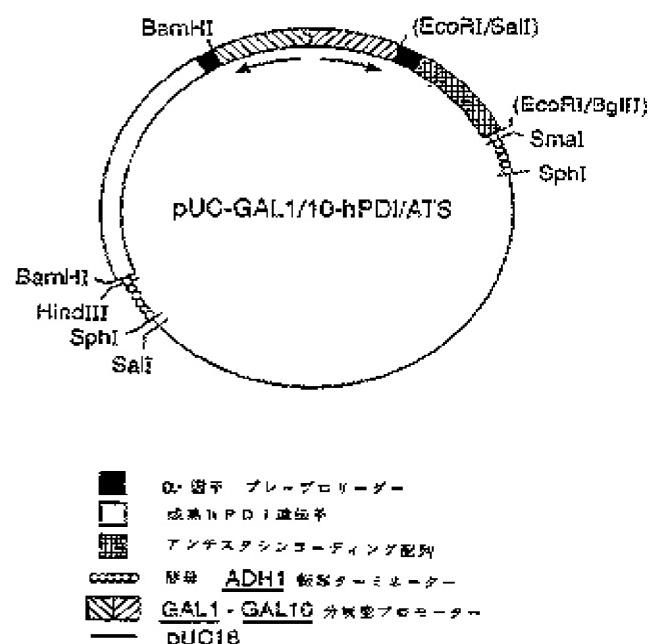


FIG. 11

七

#### Translational applications

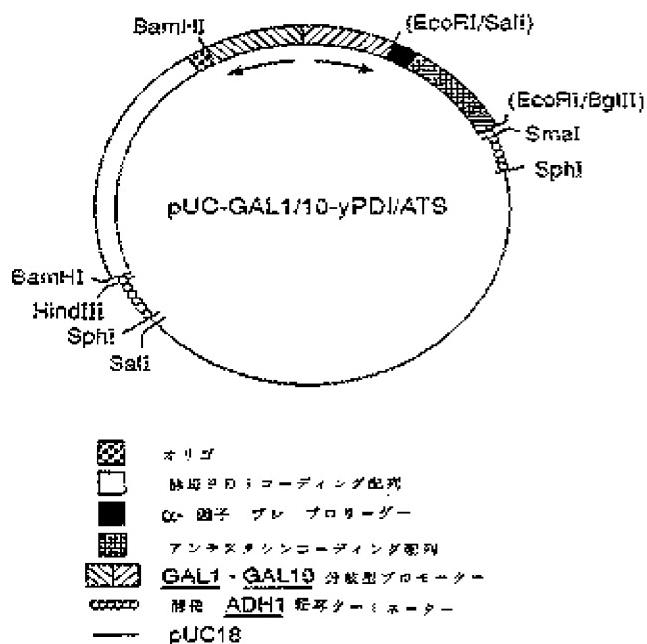


FIG. 12

国際特許報告		International publication of published patent applications
Category	Characteristics described as being equivalent to the invention	Reference to cited RIs
X	Patent, Vol. 2, issued 1995, Scherens et al., "Identification of the sequences of the yeast YCL033 gene localizes its chromosomal location with the protein kinase homologous (PKD) gene product or other organisms", pages 585-590. See also article.	1-34
Y	EP, A, 0,790,953 (Ishizukawa et al.) 07 December 1998. See examples 2 and 3 especially.	9
Y	The EMBO Journal, Vol. 6, No. 3, Plagemann et al., "Molecular cloning of the beta-subunit of human prolactin 4-hydroxyphosphate. The tubulin and protein disulfide isomerase are products of the same gene", pages 643-649. See the abstract on page 643 especially.	17, 18, 21, 32, 33
Y	Gene, Vol. 75, issued 1990, Han et al., "Cloning and expression of cDNA encoding amikacin, a heat-stable protein having anti-complex and antimagnetic properties", pages 47-57. See pages 47 and 55 especially.	14, 19
Y	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 29, issued 15 October 1990, Meier et al., "Characterization of recombinant cat anticoagulant peptide: A highly selective inhibitor of blood coagulation factor Xa", pages 17745-17752. See pages 17746 and 17751 especially.	15, 31

## フロントページの続き

(53) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庫内整理番号 F I  
 // (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 9/90  
 C 1 2 R 1:865)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
 C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG  
 , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,  
 TD, TG), AU, BE, BG, BR, CA, CZ,  
 FI, HU, JP, KR, KZ, LK, MG, MN, M  
 W, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA  
 , US

(72) 発明者 トウェイト,マイケル・エフ  
 イギリス國、ケント・シー・ティー・4・  
 7・エヌ・ビー、チャータム・ハツチ、ナ  
 イティンゲイル・クロース・3

(72) 発明者 フリードマン,ロバート・ビー  
 イギリス國、ケント・シー・ティー・1・  
 1・エツクス・アール、カンタベリー、セ  
 ント・オーガスティンス・ロード・43

(72) 発明者 シュルツ,ローレン・ティー  
 アメリカ合衆國、ペンシルバニア・19438,  
 ハーリーズビル、オーク・ドライブ・421

(72) 発明者 エリス,ロナルド・ダブリュ  
 アメリカ合衆國、ペンシルバニア・19066,  
 メリオン、シカモア・アベニュー・206

(72) 発明者 マークス,ヘンリー・ゼット  
 アメリカ合衆國、ペンシルバニア・19095,  
 ウインコート、ソーンベリー・ロード・  
 1517

(72) 発明者 モンゴメリー,ドナ・エル  
 アメリカ合衆國、ペンシルバニア・18914,  
 テヤルフォント,ヒツコリー・レーン・9